

Aus dem Institut für Immunologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Dietrich Kabelitz)
am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**UNTERSUCHUNGEN ZUR AKTIVIERUNG VON
TRANSGLUTAMINASEN DURCH DAS ZYTOKIN TUMOR
NEKROSE FAKTOR ALPHA UND CATHEPSIN D IN
FIBROBLASTEN UND KERATINOZYTEN**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Isabel Hellmich

aus Flensburg

Kiel 2011

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. S. Schütze

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. E. Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 03.11.2011

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 03. November 2011

gez.: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. I. Cascorbi

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

I

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	7
2.1	Material	7
2.1.1	Zellen	7
2.1.1.1	Fibroblasten (Maus), genetisch verändert	7
2.1.1.2	HaCat-Zellen (human)	7
2.1.2	Kulturmedien	7
2.1.3	Puffer und Lösungen	8
2.1.4	Antikörper	9
2.1.4.1	Primäre Antikörper	9
2.1.4.1	Sekundäre Antikörper	10
2.1.5	Konfokales Laserscanning-Mikroskop (CLSM)	
	Axiovert 200M/Carl Zeiss	11
2.1.6	Verbrauchs-und Gebrauchsmaterial	11
2.2	Methoden	13
2.2.1	Kultivierung von Zellen	13
2.2.2	Konservierung von Zellen	13
2.2.3	Herstellung von Lysaten	14
2.2.4	Auszählung von Zellen in der Neubauer-Zählkammer	14
2.2.5	BCA-Proteinbestimmung	15
2.2.6	SDS-PAGE	15
2.2.7	Herstellung von Sammel-und Trenngelen	16
2.2.8	Westernblot	16
2.2.9	Untersuchung der Zellen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (LSM)	18
2.2.10	Transglutaminase-Aktivitätsassay	18
3.	Ergebnisse	21
3.1	Konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie der Wildtyp- und mit CATD retransfizierten Fibroblasten sowie HaCat-Zellen	21
3.1.1	Transglutaminase 1 und CATD	21
3.1.1.1	TG1 und CATD in Wildtyp-Fibroblasten	22

II

Inhaltsverzeichnis

3.1.1.2	TG1 und CATD in mit CATD retransfizierten Fibroblasten	23
3.1.1.3	TG1 und CATD in HaCat-Zellen	24
3.1.2	Transglutaminase 2 und CATD	25
3.1.2.1	TG2 und CATD in Wildtyp-Fibroblasten	25
3.1.2.2	TG2 und CATD in mit CATD retransfizierten Fibroblasten	27
3.1.2.3	TG2 und CATD in HaCat-Zellen	28
3.1.3	Transglutaminase 3 und CATD	29
3.1.3.1	TG3 und CATD in Wildtyp-Fibroblasten	29
3.1.3.2	TG3 und CATD in mit CATD retransfizierten Fibroblasten	31
3.1.3.3	TG3 und CATD in HaCat-Zellen	32
3.2	Nachweis der Transglutaminasen im Westernblot	33
3.2.1	Transglutaminase 1 (ab 19936)	33
	A) TG1 in Wildtyp-Fibroblasten	33
	B) TG1 in HaCat-Zellen	34
3.2.2	Transglutaminase 2 (Labvision/Ab-4)	34
	A) TG2 in Wildtyp-, CATD-defizienten- und mit CATD retransfizierten Fibroblasten	34
	B) TG2 in HaCat-Zellen	36
3.2.3	Transglutaminase 3 (ab 27001)	37
	TG3 in Wildtyp-Fibroblasten	37
3.2.4	Cathepsin D	38
	CATD in Wildtyp-, CATD-defizienten- und mit CATD retransfizierten Fibroblasten	38
3.3	Transglutaminase-Aktivitätsassay	40
3.4	Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse	41
4.	Diskussion	42
5.	Zusammenfassung	49
6.	Literaturverzeichnis	51
7.	Anhang	58
7.1	Negativkontrolle der CATD-defizienten Fibroblasten	58
7.2	Transglutaminase 3 / Wildtyp-, CATD-defiziente- und mit CATD retransfizierte Fibroblasten	59
7.3	Verwendete primäre und sekundäre Antikörper in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie	60

III Inhaltsverzeichnis

8.	Danksagung	61
9.	Curriculum vitae	62

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
ARCI	Autosomal rezessive kongenitale Ichthyose
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serum Albumin
CATD	Cathepsin D
CE	Cornified Envelope
CIE	Kongenitale ichthyosiforme Erythrodermie
LSM	Laserscan-Mikroskop
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindolhydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	Enhanced-Chemiluminescence
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
FBS	Fetal Bovine Serum
HaCat	Humane adulte Keratinozyten-Zelllinie
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IL	Interleukin
kDa	Kilo-Dalton
LI	Lamelläre Ichthyose
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMFS	Phenylmethylsulfonylfluoride
PMT	Photomultiplier
POD	Peroxidase
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamid Gel Electrophoresis
SLE	Systemischer Lupus erythematosus
TBST	Tris-Buffered Saline Tween-20
TE	Trypsin-EDTA (Biochrom AG)
TEMED	Tetraethylenmethyldiamin
TG	Transglutaminase
TNF	Tumor Nekrose Faktor

1 Einleitung

1. Einleitung

Transglutaminasen bilden eine große Familie intra- und extrazellulär lokalisierter Enzyme. Sie sind verantwortlich für die kovalente Verknüpfung von Proteinen. Transglutaminasen katalysieren hauptsächlich posttranslationale Modifikationen, welche die kovalente Quervernetzung von Proteinen zur Folge haben (Santos and Torné, 2009). Diese Quervernetzung ist eine Ca^{2+} -abhängige Reaktion, bei der ein primäres Amin mit der Amidgruppe eines Glutaminrestes verknüpft wird.

Die daraus entstehende Isopeptidbindung führt häufig zur Ausbildung unlöslicher, supramolekularer Strukturen, die der Stabilisierung von Geweben dienen (Greenberg et al. 1991).

Heute sind neun homologe Mitglieder der Transglutaminasen-Familie bekannt (Grenard et al. 2001):

<u>Name</u>	<u>Synonyme</u>	<u>kDa</u>	<u>Vorkommen</u>	<u>Lokalisation</u>
TG1	TG _K , Keratinocyte TG, Type 1 TG	90	Epithelien	zytosolisch, membranständig
TG 2	TG _C , Tissue TG, Type 2 TG	80	ubiquitär	zytosolisch, nukleär, extrazellulär
TG 3	TG _E , Epidermal TG, Type 3 TG	77	Epithelien, Haarfollikel	zytosolisch
TG 4	TG _P , Prostate TG, Type 4 TG	77	Prostata	extrazellulär
TG 5	TG _X , Type 5 TG	81	Epithelien	zytosolisch
TG 6	TG _Y , Type 6 TG	unbekannt	unbekannt	unbekannt
TG 7	TG _Z , Type 7 TG	80	ubiquitär	unbekannt
F XIII	Factor XIIIa, Plasma TG, Fibrin Stabilizing Factor	83	Blut, Plasma, Thrombozyten	extrazellulär
Band 4.2	Erythrocyte protein band 4.2	77	Erythrozyten	membranständig

Tab.1: Übersicht der Transglutaminasen

2 Einleitung

Transglutaminasen stellen eine große Familie von Proteinen dar (Ichinose et al., 1990), welche ubiquitär im Körper vorkommen. Demzufolge erscheinen Proteine, die durch Transglutaminasen modifiziert wurden, überall im Organismus. Einige Beispiele hierfür sind im Rahmen der Wundheilung, Ausbildung der Extrazellulärmatrix und des Cornified Envelope der Epidermis (Greenberg et al., 1991) beschrieben.

Bei dem Cornified Envelope (CE) handelt es sich um eine spezielle Hornschicht, die sich aus proteinreichen Keratinozyten und einem sie umgebenden lipidreichen Extrazellularraum zusammensetzt (Elias and Friend 1975). In der menschlichen Haut wird der CE auch als Stratum corneum bezeichnet, es besitzt in seiner Peripherie eine Struktur aus terminal differenzierten Keratinozyten, den sog. Korneozyten (Eckert et al., 2005). Die Lipide im Extrazellularraum setzen sich aus einem Gemisch von Sphingolipiden (Ceramiden), Cholesterol und freien Fettsäuren zusammen, die von den Keratinozyten synthetisiert und vorläufig in sogenannten ‚lamellar bodies‘ im oberen Stratum spinosum und Stratum granulosum, den beiden mittleren Schichten der menschlichen Haut, gespeichert werden (Abb. 18). Die ‚lamellar bodies‘ sind spezialisierte, sekretorische Granula des keratinisierenden Plattenepithels. Sie gelten als lysosomenverwandte Organellen. Neben den Lipiden enthalten sie noch zahlreiche Enzyme, wie Proteasen, Glukosidasen und Lipasen (Madison et al., 1998) sowie Cathepsin D.

Im Laufe der Differenzierung der Keratinozyten wird der Inhalt der ‚lamellar bodies‘ über Fusion mit der apikalen Zellmembran in den Extrazellularraum abgegeben. Es wird angenommen, dass die in den ‚lamellar bodies‘ lokalisierten Enzyme essentiell für die Bildung der Schutzschicht der Epidermis sind und an der Abschuppung von Keratinozyten mitwirken (Hayward, 1979; Odland and Holbrook, 1981). Fehlen oder funktionelle Defizite einzelner Enzyme der ‚lamellar bodies‘ resultieren in schweren Hautkrankheiten (Chavanas et al., 2000; Sprecher et al., 2005; Akiyama, 2006). Veränderungen der Lipidzusammensetzung und der epidermalen Differenzierung führen zu einer gestörten Hautbarriere.

Die gestörte Hautbarriere ist eine wichtige Komponente bei der Pathogenese der Kontaktdermatitis, der Ichthyose, der atopischen Dermatitis und der Psoriasis (Jensen and Proksch, 2009).

Ishida-Yamamoto et al. (2004) zeigten die Anwesenheit der Aspartatprotease Cathepsin D (CATD) in den epidermalen ‚lamellar bodies‘ und deren Sekretion an der apikalen Seite von Keratinozyten. Cathepsin D katalysiert somit mit großer Wahrscheinlichkeit extrazelluläre

3 Einleitung

Substrate und ist beteiligt am Abschuppungsprozess der Epidermis, was in anderen Untersuchungen bereits vermutet wurde (Horikoshi et al., 1998, 1999).

Transglutaminasen werden ubiquitär in niedrigen Konzentrationen exprimiert, in einer Vielzahl von Erkrankungen kann eine Aktivierung und/oder erhöhte Expression von Transglutaminasen beobachtet werden.

Sie sind von pathologischer Bedeutung z.B. bei folgenden Erkrankungen:

Verschiedene Mutationen der humanen Transglutaminase 1 (TG1) wurden in autosomal rezessiven kongenitalen Ichthyosen (ARCI), bei der lamellären Ichthyose (LI) und der kongenitalen ichthyosiformen Erythrodermie (CIE) nachgewiesen. Ichthyosen sind monogenetische Verhornungsstörungen der Haut. Bei Ichthyosen ist das natürliche Abschilfern der toten Hornzellen des Stratum corneum in kleinen nicht sichtbaren Schuppen gestört und es kommt zur Ausbildung großer, sichtbarer Hautschuppen. Im Fall der lamellären Ichthyose haben mindestens 90% der Patienten eine Mutation der Transglutaminase 1 (Huber et al., 1995; Russell et al., 1995; Candi et al., 1998; Akiyama et al., 2001). Bis heute wurden über 100 verschiedene Mutationen der Transglutaminase 1 in Individuen mit autosomal rezessiver kongenitaler Ichthyose identifiziert (Herman et al., 2009).

Die Transglutaminase 2 wird in den basalen Schichten der Epidermis exprimiert, wo sie bei der Quervernetzung von Proteinen zur Stabilisierung der Extrazellulärmatrix beteiligt ist (Aeschlimann and Paulsson, 1991; Aeschlimann and Thomazy, 2000). Sie besteht aus zwei Untereinheiten, TG2- α mit 74-85 kDa und TG2- β mit 50 kDa (Mhaouty-Kodja, 2004).

TG2 ist die am weitesten verbreitete Transglutaminase in den Geweben. Es kommt zu einer Anreicherung von Transglutaminase 2 in Zellen, die die terminale Differenzierung durchlaufen, sowie an den Rändern von Wunden und bei inflammatorischen Prozessen.

Eine erhöhte TG2 Aktivität führt zur Fibrose in vielen Organen, was auf eine zentrale Rolle des Enzyms in der Kontrolle der Fibroblastenaktivität hinweist (Aeschlimann and Thomazy, 2000; Small et al., 1999). Eine erhöhte TG2 Expression kann in entzündlichen Erkrankungen, wie der inflammatorischen Myositis, sowie LPS-induzierter Inflammation und der Zöliakie nachgewiesen werden (D'Argenio et al., 1995; Lee et al., 2004; Karpuj et al., 2002).

Baek et al. (1996) berichteten über TG2- β , einem Protein von ungefähr 50 kDa, welches gleichmäßig mit TG2- α auftritt. Zudem verursacht TG2- β eine Minderung der GTPase-Funktion von TG2- α durch Bindung an GDP-gebundener TG2- α .

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Bindung von GTP an TG2 wichtig für das Überleben der Zelle ist, TG2 hier also eine protektive Funktion erfüllt (Datta et al., 2007).

TG2 ist darüber hinaus auch im Effektor-Signalweg des Zelltodes (Apoptose) involviert und präsentiert sich in diesem Kontext mit zwei Gesichtern: Einerseits kann das Enzym pro-apoptotisch aber auch anti-apoptotisch wirken (Piacentini, 2005; Fésüs and Szondy, 2005). Hierzu zeigten Antonyak et al. (2006), dass TNF- α vor allem die zytotoxische/pro-apoptotische TG2- β induziert.

Aber auch eine Beteiligung der TG2 an der Aktivierung von NF- κ B wurde postuliert, welches wiederum für die Generierung der proinflammatorischen Mediatoren Stickstoffmonoxid und TNF- α verantwortlich ist (Suh et al., 2006; Kim, 2006).

Die Expression der TG2- α in Krebszellen als auch in Fibroblasten schützt dagegen vor Apoptose. Im Gegensatz hierzu führt die Expression von TG2- β zu einer Induktion des Apoptoseweges. TNF- α führt zu einer spezifischen Hochregulation der TG2- β -Expression. Eine Elimination (knock-down) von TG2- β zeigte eine partielle Reduktion der durch TNF- α induzierten Apoptose (Antonyak et al., 2006).

Szondy et al. (2003) untersuchten die Rolle von TG2 bei der Apoptose. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass ein Mangel an TG2 auf zwei Vorgänge Einfluss hat: der Apoptose von Zellen und deren Beseitigung.

Die TG2 wird auf Stimulation von Akute-Phase-Zytokinen, wie IL-6 und TNF- α vermehrt exprimiert (Aeschlimann and Tomazy, 2000). Allerdings wurde hier durch die Autoren nicht näher bezeichnet, ob es sich um TG2- α oder TG2- β handelt. Nach den oben bereits genannten Forschungsergebnissen von Antonyak et al. (2006) scheint TNF- α jedoch die Produktion von TG2- β zu stimulieren.

Die Transglutaminase 2 (TG2) scheint in erster Linie an einer Vielzahl entzündlicher Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen außerhalb des Hautorgans beteiligt zu sein. Unter anderem Zöliakie, rheumathoider Arthritis, Multipler Sklerose, Diabetes mellitus Typ II und neurodegenerativer Erkrankungen (Facchiano et al., 2006).

Die TG2-vermittelte Quervernetzung von Proteinen spielt eine entscheidende Rolle bei der Stabilisation der Extrazellulärmatrix und fördert Zellmatrix-Interaktionen (Aeschlimann and Paulsson, 1991; Aeschlimann and Thomazy, 2000; Aeschlimann et al., 1995; Martinez et al., 1994; Corbett et al., 1997; Verderio et al., 1998; Gaudry et al., 1999).

Auch wurde von Lipopolysaccharid-vermittelter TG2 Expression in vielen Geweben und Organen beim septischen Schock berichtet (Leu et al., 1982; Bowness and Tarr, 1997).

Kürzlich wurde TG2 mit der Pathogenese des systemischen Lupus erythematoses (SLE) in Verbindung gebracht (Szondy et al., 2003; Pitidhamabhorn et al., 2006). Eine andere

Studie zeigte bei TG2-defizienten Mäusen lupusähnliche Symptome, wie die Bildung von Autoantikörpern, die Immunkomplexglomerulonephritis und eine verminderte Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Makrophagen (Falasca et al., 2005).

Der systemische Lupus erythematoses ist charakterisiert durch eine Dysregulation des Immunsystems und der Produktion von Autoantikörpern. Multiple Zytokine sind an der Pathogenese des SLE beteiligt, einschließlich Tumornekrosefaktor-Alpha (TNF- α) und Interleukin-1, IL-4, IL-6, IL-10 und IL-18 (Mok and Lau, 2003; Aringer and Smolen, 2005).

Transglutaminase 3 (TG3) wird während des späten Stadiums der terminalen Differenzierung der Haut und in bestimmten Zelltypen von Haarfollikeln exprimiert (Kim et al., 1993). Es wird angenommen, dass das Enzym bei der Quervernetzung von Proteinen und an der Bildung des Cornified Envelopes (CE) beteiligt ist (Steven and Steinert, 1994).

TG3 ist in der Haarmorphogenese involviert. TG3-defiziente Mäuse zeigten gewelltes Fell und gekrümmte Schnurrhaare. Während der Haarphänotyp mit zunehmendem Alter nachlässt, bleibt die Krümmung der Schnurrhaare erhalten (John, 2006).

Eine Abnahme der TG3-Expression fand sich im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus verglichen mit gesundem Gewebe, wo TG3 stark exprimiert wurde (Chen et al., 2000a).

TG3-Expression könnte somit als ein neuer prognostischer Marker des ösophagealen Plattenepithelkarzinoms zum Einsatz kommen (Uemura et al., 2009).

Im Rahmen von Vorarbeiten im Institut für Immunologie konnte gezeigt werden, dass die exogene Zugabe von Cathepsin D (CATD) zu Keratinozytenkulturen zu einer Aktivitätssteigerung der TG1 führt (Egberts et al., 2004).

CATD ist eine Aspartatprotease, die im rauen endoplasmatischen Retikulum als Preprocathepsin D synthetisiert wird. Nach der Abspaltung des Signalpeptids, wird Procathepsin D (52 kDa) zu intrazellulären Strukturen, wie z.B. Lysosomen, Endosomen und Phagosomen transportiert. Dort erfolgt eine Abspaltung des 44 Aminosäure großen N-terminalen Endes, wodurch ein enzymatisch aktives intermediäres Proenzym von 48 kDa entsteht. Eine unvermittelt weitere proteolytische Spaltung führt zu einer reifen, aktiven Protease, die sich zusammensetzt aus einer schweren Kette (32 kDa) und einer leichten Kette (14 kDa), welche über eine nicht-kovalente Verbindung zusammengehalten werden (Benes et al., 2008).

Ceramide binden spezifisch an CATD und induzieren dadurch dessen proteolytische Aktivität (Heinrich et al., 2000).

Cathepsin D wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, u.a. der Epidermis (Horikoshi et al., 1998). Sie ist primär in Lysosomen und dem Golgi-Apparat lokalisiert, in Keratinozyten

auch in lamellären Granula, die auf der apikalen Seite/Oberfläche sezerniert werden (Ishida-Yamamoto et al., 2004). Horikoshi et al. (1998) vermuten, dass CATD auf diese Weise extrazelluläre Reaktionen katalysiert und an der Abschuppung bzw. Abschilferung (Desquamation) der obersten Hautschicht, des Stratum corneum beteiligt ist.

Desweiteren konnte in Tiermodellen eine essentielle Bedeutung für die Proteolyse von Zellwachstum-regulierenden Proteinen sowie für die Gewebemöostase, nämlich Gewebeumbau (sog. „remodelling“) und Zellerneuerung gezeigt werden (Benes et al., 2008). Eine Beteiligung von CATD wird im Rahmen von Wundheilungsprozessen, der epidermalen Differenzierung sowie bei der Autoimmunerkrankung Psoriasis beschrieben (Egberts et al., 2004). Auch im Rahmen von Hauttumoren und deren Metastasen wird eine erhöhte Expression von CATD berichtet (Kawada et al., 1997; Fröhlich et al., 2004).

Ziel dieser Arbeit war es daher zunächst zu klären, ob eine Interaktion zwischen CATD und der TG1 stattfindet. Zweitens, ob auch andere Mitglieder der Familie der Transglutaminasen, insbesondere die an vielen entzündlichen Prozessen beteiligte TG2 durch CATD direkt oder indirekt reguliert werden. Und drittens, ob TNF- α , ein primäres pro-inflammatorisches Zytokin, zur Aktivierung von CATD oder den Transglutaminasen beiträgt.

2.1 Material

2.1.1.1 Fibroblasten (Maus), genetisch verändert

(Bezogen von Prof. Paul Saftig, Biochemisches Institut, Uni Kiel).

Bei der HaCat-Zelllinie handelt es sich um humane, immortalisierte und tumorfreie Keratinozyten. Sie wurden von Prof. Dr. Dr. E. Proksch aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Universitätsklinikums Kiel zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie kam ursprünglich aus dem Krebsforschungszentrum Heidelberg (Boukamp et al., 1988).

DMEM: + 4,5 g/l Glucose
+ L-Glutamine
+ 25 mM Hepes

PBS:

135 mM NaCl
6,5 mM Na ₂ PO ₄
2,6 mM KCL
1,5 mM KH ₂ PO ₄
pH 7,4

Lysispuffer: 150 mM NaCl
50 mM Tris-HCl
pH 7,5
0,5% NP40

Lysispuffer zur Lysatherstellung: 40 µl Böhlinger Complete

8 Material und Methoden

Trypsin-EDTA:	auf 1 ml mit Lysispuffer auffüllen Biochrom AG
---------------	---

FBS (10%)	Biochrom AG
-----------	-------------

P/S (1%)	Penicillin/Streptomycin
----------	-------------------------

Freeze-Medium:	70% FBS 10% DMSO 20% DMEM (ohne Zusätze)
----------------	--

2.1.3 Puffer und Lösungen

TBST:	150 mM NaCl 50 mM Tris/HCl pH 7,0 0,1% Tween-20 in wässriger Lösung
-------	--

SDS-PAGE-Auftragspuffer: (loading buffer 3x)	50 mM Tris/HCl pH 6,8 12% Glycerin 4% SDS 2% β -Mercaptoethanol 0,01% Bromphenolblau
---	---

SDS-PAGE-Laufpuffer (10x):	25 mM Tris pH 8,8 192 mM Glycin 0,1% SDS in wässriger Lösung
----------------------------	---

Trenngelpuffer:	1,5 M Tris, pH 8,8
-----------------	--------------------

Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris, pH 6,8
------------------	--------------------

9
Material und Methoden

Molekulargewichtstandards:	PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) : 170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 33 kDa, 24 kDa, 17 kDa, 11 kDa
Transblotpuffer (10x):	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% Methanol pH 8,3
TNF-α:	5 µl (1 mg/ml) auf 1:10 mit Nährmedium verdünnt, dies entspricht einer Endkonzentration von 50 ng/ml im Assay
ProLong® Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen™)	
Block-Reagenz:	1,25 g Milchpulver auf 25 ml TBST (1x)
ECL-Reagenz:	GE Healthcare/Amersham ECL Western Blotting Systems/ Detection Reagent 1+2
BCA-Reagenz (Pierce):	BCA™ Protein Assay Reagent A+B
BCA-Standard	BSA 2 mg/ml von Pierce
Saponin-Lsg.:	0,1% Saponin 0,2% BSA in PBS
Assay-Lsg.:	siehe unter 2.2.10

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Primäre Antikörper

10
Material und Methoden

Anti-TG1-AK:	Abcam [SPM398], Code No. ab19936, mouse monoclonal
Anti-TG2-AK:	Labvision (Ab-4), Cat.No. RB-060-P0, rabbit polyclonal
Anti-TG3-AK:	Abcam, Code No. ab27001, rabbit polyclonal
Anti-CATD-AK:	Santa Cruz (E-7), Cat.No. Sc-13148, mouse monoclonal against human
Anti-CATD-AK:	Calbiochem, Cat.No. 219361, rabbit polyclonal against human
Anti-CATD-AK:	dankend erhalten von Frau Dr. Pohlmann (Universität Münster), rabbit polyclonal against mouse
Anti-CATD-AK:	R&D Systems Minneapolis, Cat.No. AF 1029, polyclonal goat IgG against mouse

2.1.4.2 Sekundäre Antikörper

Westernblot:

Peroxidase-conjugated AffiniPure

Rabbit Anti-Mouse-AK IgG (H+L):	dianova
	Code No. 315-035-045
	Lot: 68587

Peroxidase-conjugated AffiniPure

Goat Anti-Rabbit-AK IgG (H+L):	dianova
	Code No. 111-035-045
	Lot: 66659

Immunfluoreszenz:

AF-555 donkey anti-goat-AK IgG (H+L):	Molecular Probes
	A-21432/Lot: 93C2-1

AF-488 donkey anti-mouse-AK IgG (H+L):	Molecular Probes
	A-21202/Lot: 84D1-1

AF-633 donkey anti-goat-AK IgG (H+L):	Molecular Probes
	A-21082/Lot: 84D1-1

AF-555 donkey anti-rabbit IgG-AK (H+L):	Molecular Probes
	A-31572/Lot: 47703A

2.1.5. Konfokale Laserscan-Mikroskopie (LSM) Axiovert 200M/Carl Zeiss

Das Prinzip der konfokalen Laserscan-Mikroskopie wurde 1955 von M. Minsky entwickelt. Hierbei wird ein Laserstrahl auf einen kleinen Objektbereich fokussiert. Die sich im Lichtweg des Laserstrahls befindlichen Fluoreszenzmoleküle werden angeregt. Das entstehende Fluoreszenzlicht wird zurückgeleitet und auf eine Lochblende („Pinhole“) fokussiert. Licht aus Bereichen des Objekts, das nicht in der Brennebene liegt wird durch das Pinhole ausgeblendet. Der Photomultiplier (PMT) detektiert deshalb nur Licht aus der Fokusebene des Objekts.

Da man lediglich Licht aus einem Punkt der Probe erhält, ist es notwendig die Probe abzurastern, so kommt es zu einer Schichtaufnahme des Bildes am Computer.

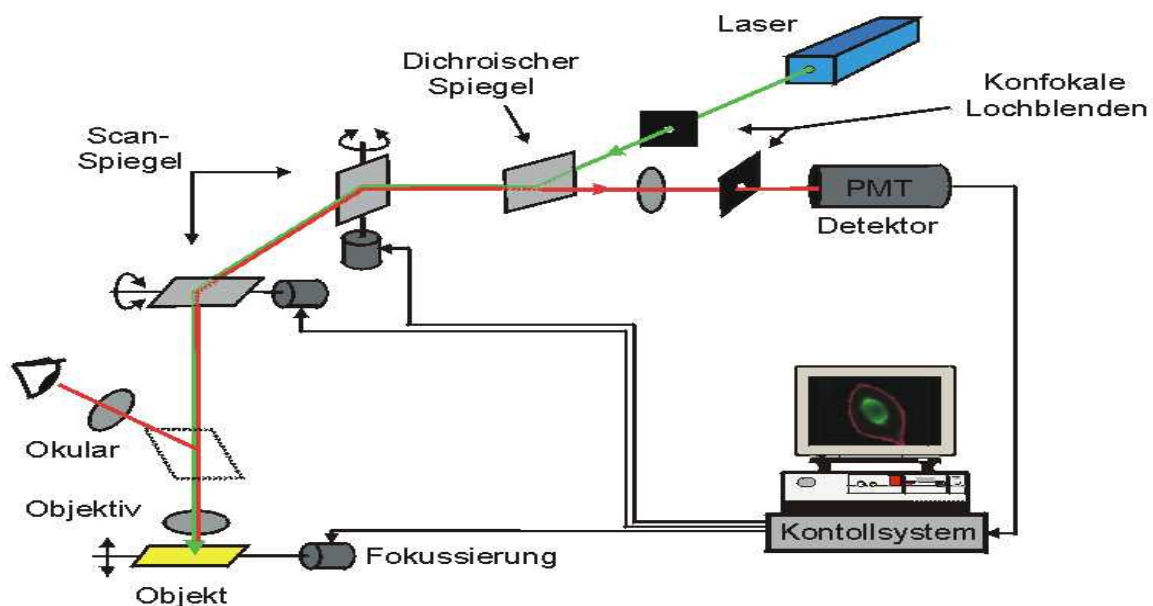


Abb.1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines konfokalen Laserscan-Mikroskops (www.sinnesphysiologie.de/methoden/fluo/scannl.htm)

2.1.6 Verbrauchs – und Gebrauchsmaterial

Petrischalen

Falcon® Becton Dickinson Labware

Primaria™ Zellkulturschalen

100 x 20 mm Style/sterile

12
Material und Methoden

Filmpapier	GE Healthcare Amersham Hyperfilm™ ECL
Cover Slips	BD Bioscience BD BioCoat™ Cell Environments Collagen Typ I Cellware
Reagiergefäße (1,5 ml)	Sarstedt
Kryo-Röhrchen	Greiner bio-one Cellstar®
Pipettenspitzen	Sarstedt
Einmalpipetten (5 ml/10 ml/25 ml)	Greiner bio-one Cellstar® Serological Pipette
Blue Cap (15 ml/50 ml)	Greiner bio-one Cellstar®
ECL-Film	Hybond™-ECL™ Amersham Biosciences Nitrocellulose membrane
Sterilbank	Heraeus Lamin Air® Instruments/HB 2472K
Zentrifugen	Minifuge RF Heraeus Sepatech/EYDAM Hettich/Mikro 200R
Kulturflaschen	Greiner bio-one

	Cellstar® Tissue culture flasks/250 ml
Zellkulturplatte	Greiner bio-one Cellstar® 6 well-plate/sterile, with lid
Neubauer Zählkammer	Tiefe 0,100 mm Fläche 0,0025 mm ²
Cellulose-Filterpapier	Whatman, Maidstone, U.K.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung erfolgte in 250 ml Gewebekulturflaschen. Als Nährmedium diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)+Zusätze. Zusätzlich wurden dem Nährmedium noch 1% Penicillin/Streptomycin und 10% FBS zugefügt.

Adhärente Zellen in Kultur wurden nach zweimaligem Waschen mit je 5 ml PBS mit 2,5 ml Trypsin-EDTA versetzt und für 5-10 Minuten bei 37°C inkubiert, wobei sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche lösen. Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Anschließend werden 7,5 ml Nährmedium der Suspension hinzufügen, um das Trypsin zu neutralisieren.

Neue 250 ml Gewebekulturflaschen mit ca. 25 ml Nährmedium und 1-2 ml der entstandenen Zellsuspension versehen. Die Inkubation erfolgte im 37°C Brutschrank mit 5% CO₂ und annähernd 100% Luftfeuchtigkeit für 2 Tage, danach müssen die Zellen wieder in neuem Nährmedium verdünnt umgesetzt werden.

2.2.2 Konservierung von Zellen

Bei der Konservierung von Zellen muss auf absolute Sterilität geachtet werden. Zunächst wird eine Zellsuspension wie oben beschrieben hergestellt. Die entstandene Zellsuspension wird für 5 Minuten bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert.

Der Nährmediumüberstand wird verworfen, die Zellen mit 2 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert.

Der Überstand wird mit einer sterilen Pipette abgesaugt. Danach werden 2 ml Freeze-Medium auf das Pellet gegeben und die Zellen resuspendiert. Anschließend werden die

Zellen in 2 Kryo-Röhrchen à 1 ml pipettiert. Die Kryo-Röhrchen werden nun etappenweise eingefroren (-20 °C/-80 °C/-198 °C → flüssiger Stickstoff).

2.2.3 Herstellung von Lysaten

Die ersten Schritte zur Herstellung von Lysaten aus Zellkulturen entsprechen denen der Kultivierung von Zellen (siehe hierzu Abschnitt 2.2.1).

Die entstandene Zellsuspension wird nun für 5 Minuten bei 400 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wird der Nährmedium-Überstand verworfen und die Zellen zweimal mit ca. 5 ml PBS gewaschen.

Die resuspendierten Zellen wurden nach Zugabe von 100 µl Lysispuffer in ein Eppendorfgefäß pipettiert.

Der zugefügte Lysispuffer (Böhringer Complete) enthält Protease-Inhibitoren, die die proteolytische Degradation verhindern. Eine dabei aktiv bleibende Protease ist Cathepsin D.

Anschließend erfolgt eine Zentrifugation für 7 Minuten bei 20.000 x g und 4 °C.

Der Überstand wird in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert. Der Überstand entspricht dem Gesamtlusat der Zellen, bestehend aus Membranen, Zellorganellen und Zytosol.

2.2.4 Auszählung von Zellen in der Neubauer-Zählkammer

Die Neubauer-Zählkammer besteht aus 8 großen Quadraten, die wiederum aus 16 kleinen Quadraten bestehen. Die Zählkammer wird mit einem Deckgläschen versehen, welches so lange mit leichtem Druck auf die Zählkammer gepresst wird, bis sich darunter am äußeren Rand der Zählkammer Newton'sche Ringe bilden. Nun werden 10 µl der Zellsuspension unter das Deckgläschen pipettiert. Die Auszählung erfolgt unter einem Mikroskop mit einem 10x Objektiv und 4-6 Lichtstärken. Es werden 2 x 16 Quadrate, welche sich gegenüberliegen sollten, meander- und L-förmig ausgezählt. Aus der Anzahl der Zellen bei den beiden Auszählungen wird nun der Mittelwert berechnet.

Der Wert entspricht: Mittelwert x 10⁴ Zellen / ml

Zum Ausplattieren der Zellen werden unterschiedliche Zellzahlen benötigt, je nach Größe des verwendeten Materials.

Für die Western-Blot-Analysen:	Petrischalen (Ø 10 cm) → 1 x 10 ⁶ Zellen/ml
Für die Fluoreszenzmikroskopie:	Cover Slips → 5 x 10 ⁴ Zellen/ml

2.2.5 BCA-Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehalts der Lysate wurde der BCA-Assay (Fa. Pierce, Illinois, USA) durchgeführt.

Das Prinzip beruht auf einer Reduktion von Kupferionen mit Hilfe von Bicinchoninsäure in einem alkalischen Milieu. Durch Komplexbildungen mit den Peptidbindungen der Proteine kommt es zu einer Farbreaktion, welche photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen wird. Als BCA-Standard wird BSA in Konzentrationen von 0-1,0 mg/ml verwendet.

2.2.6 SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Mit dieser Methode werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (SDS-PAGE, Laemmli, 1970). Es werden Acrylamidgele verwendet, deren Porengröße sich durch Veränderung des Acrylamid/Bisacrylamid-Gehaltes verändern lässt (Herstellung von Gelen siehe 2.2.7).

Die Elektrophoresekammer wird mit SDS-Laufpuffer bis ca. zur Hälfte befüllt. Nun werden die Gele eingespannt. Nach dem Einspannen der Gele wird die Kammer vollständig mit Laufpuffer befüllt, so dass die Geltaschen geflutet sind.

Die Proben werden mit Auftragspuffer, welcher β -Mercaptoethanol enthält, versetzt und anschließend 3 Minuten gekocht, um die Proteine zu denaturieren. Das Reagenz β -Mercaptoethanol führt zu einer Reduktion der Disulfidbrücken der Proteine, so dass diese als Monomere vorliegen. Die denaturierten Proteine werden durch SDS mit einer stark negativen Ladung versehen. Anschließend werden die Proben in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wird ein standardisierter Marker mit Proteinen bekannter Molekulargewichte aufgetragen, um die Molekulargewichte der unbekannten Proteine der Proben zu bestimmen.

Die Elektrophorese erfolgt durch Anlegen einer Stromstärke von 25 mA/Gel (Biometra Power Pac) für ca. 1h. Während der Elektrophorese wandern die Proteine in einem elektrischen Feld zur Anode und werden dabei proportional zum Logarithmus ihrer Molekulargewichte aufgetrennt. Durch Bromphenolblau, welches sich im Auftragspuffer befindet, wird die Lauffront der Proben sichtbar gemacht. Wenn sie am unteren Gelende angekommen ist, wird der Lauf gestoppt.

2.2.7 Herstellung von Sammel-und Trenngelen

	Sammelgel (5%)	Trenngel (10%)	Trenngel (12,5%)
Acrylamid/Bisacrylamid (40%)	0,625 ml	3,33 ml	6,25 ml
1,5 M Tris pH 8,8	-	3,33 ml	5 ml
0,5 M Tris pH 6,8	1,2 ml	-	-
20% Glycerin	-	6,54 ml	8,55 ml
Aqua dest.	3,075 ml	-	-
SDS 10%	0,050 ml	0,150 ml	0,230 ml
TEMED	0,005 ml	0,013 ml	0,020 ml
APS (10%)	0,050 ml	0,070 ml	0,100 ml
Gesamtvolumen	5 ml	13,33 ml	20 ml

Tab.2: Zusammensetzung der Gele

Die Polymerisation wird durch Zugabe von APS gestartet. Zuerst wird das Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen, welches dann direkt danach mit dem Sammelgel überschichtet werden kann, da der enthaltene Glycerinanteil im Trenngel eine Durchmischung der beiden Lösungen verhindert.

Die hergestellten Gele sollten mindestens 1h stehengelassen werden, um eine vollständige Polymerisation zu gewährleisten.

Aus den oben angegebenen Mengenangaben lassen sich zwei Gele herstellen.

2.2.8 Westernblot

Der Westernblot (Towbin et al., 1979) dient dazu, die nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteinbanden durch Elektrophorese von dem Acrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran zu übertragen. So können die Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert werden.

Es wurde die Naßblottechnik verwendet, bei der das Gel unmittelbar nach der SDS-PAGE in einen Blotapparat (Minitransblot, Biorad) eingebaut wurde.

Der Aufbau des "Blotsandwiches" war wie folgt: Schwamm, Whatmannfilter, Gel, Nitrocellulosemembran, Whatmannfilter, Schwamm.

Alle Bestandteile wurden in Blotpuffer getränkt und beim Zusammenschichten darauf geachtet, dass keine Luftblasen eingeschlossen werden.

Der eigentliche Transfer erfolgte dann in gekühltem Transblotpuffer bei einer Spannung von 100V für 60 Min.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrocellulosemembran mit 5% Milchpulver-Lösung für ca. 1h auf einem Horizontalschüttler (IKA-Labortechnik, Staufen) inkubiert. Nach drei fünfminütigen Waschschritten in TBST erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper in einer Konzentration von z.B. 1:1000 in TBST bei 4°C über Nacht oder bei Raumtemperatur für 1h.

Anschließend wurde ungebundener primärer Antikörper durch dreimaliges Waschen für jeweils 5 Minuten in TBST entfernt.

Die folgende Inkubation mit dem POD-gekoppelten Sekundärantikörper wurde in einer Konzentration von z.B. 1:10000 in TBST bei Raumtemperatur für 1h durchgeführt.

Nach der Inkubation erfolgten wieder die Waschschrritte in TBST.

Um die Proteine, an die sich die Antikörper gebunden haben nachweisen zu können, wurde die Methode der verstärkten Chemilumineszenz (ECL; Amersham, Braunschweig) durchgeführt.

Die Nitrocellulosemembran wurde gleichmäßig für eine Minute mit der ECL-Detektionslösung Nr. 1 und Nr. 2 versetzt, welche kurz vor der Untersuchung im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Durch die an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase kommt es zu einer Oxidation von Luminol in alkalischem Milieu. Überschüssiges Reagenz wurde nach Ablauf der Reaktionszeit abgegossen. Die Membran wurde vorsichtig trocken getupft und in durchsichtige Folie verpackt. Das durch die Reaktion mit Luminol emittierte Licht wurde mittels HyperfilmTM-ECL in der Dunkelkammer detektiert. Die Filme wurden mit unterschiedlichen Expositionszeiten belichtet und anschließend in einen Entwickler (Crurix 60, Agfa) eingeführt.

Die Auswertung der Banden erfolgte nach Einscannen der Filme mit dem Computerprogramm Aida Image Analyzer V.4.04 von Raytest. Das Programm ermöglicht die Messung der Intensität der Banden in Form von Grauwerten pro Flächeneinheit. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die Intensität der Schwärzung des Films und die Breite der Bande mit der Proteinkonzentration im Bereich der Bande korrelieren. Die gemessenen Werte werden ins Verhältnis zu den Banden gesetzt, so dass im Folgenden mit Prozentwerten gearbeitet werden konnte.

2.2.9 Untersuchung der Zellen mittels konfokaler Laserscan-Mikroskopie (LSM)

Für die Untersuchung im LSM wurden 5×10^4 Zellen pro Deckgläschen eingesetzt. Einen Tag vor dem eigentlichen Versuchsbeginn wurden die Zellen ausgezählt und die benötigten Deckgläschen in 6-well-plates mit der Nährmedium-Zellsuspension versetzt. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 24h bei 37 °C, um den Zellen ein Anwachsen auf den Deckgläschen zu ermöglichen.

Am nächsten Tag wurde das Nährmedium abgenommen und die CoverSlips zweimal in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Fixierung der Zellen mit 7%-iger Formalinlösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Danach erfolgten zwei weitere Waschschriffe in PBS.

Zur Permeabilisierung der Plasmamembran der Fibroblasten beziehungsweise der Zellwand der HaCat-Zellen wurden die Zellen für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit Saponin-Lösung inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die Antikörperinkubation erfolgte in einer mit angefeuchtetem Kim-Wipe und Parafilm ausgelegten Petrischale. Pro Deckgläschen wurden 50 µl Antikörperlösung benötigt. Alle primären Antikörper wurden in einer Konzentration von 1:50 eingesetzt, sekundäre Antikörper in einer Konzentration von 1:100 in PBS. Die Inkubationen erfolgten bei 4 °C über Nacht oder für 1 Stunde bei Raumtemperatur (abgedunkelt). Zwischen den einzelnen Inkubationen erfolgten erneut die Waschschriffe in PBS. Nach den Inkubationen wurden die Deckgläschen auf mit Ethanol gereinigte Objektträger aufgebracht. Für die Einbettung wurde ‚ProLong® Gold antifade reagent with DAPI‘ verwendet. Nach der Aushärtung erfolgte die Auswertung am konfokalen Laserscanning-Mikroskop ´Axiovert 200M / Carl Zeiss´.

2.2.10 Transglutaminase-Aktivitätsassay

Die Methode zur Messung der Transglutaminase-Aktivität erfolgte wie beschrieben (Hohl et al., 1998). Es handelt sich um einen Aktivitätstest, der auf dem Prinzip beruht, dass Transglutaminasen in der Lage sind Substratproteine mit Casein zu komplexieren. Als Substratprotein wird radioaktiv markiertes Putrescine ($[^3\text{H}]\text{Putrescine}$) verwendet. Die gemessene Radioaktivität, des mit Dimethylcasein verknüpften $[^3\text{H}]\text{Putrescine}$ ist ein Maß für die Transglutaminase-Aktivität. Die Transglutaminase-Aktivität wird ausgedrückt als pmol $[^3\text{H}]\text{Putrescine}$ inkorporiert in Dimethylcasein pro Stunde und mg Protein.

Die Probe hat ein Volumen von 50µl (x µl Proteinlösung + y µl Präparationspuffer)

19
Material und Methoden

55µl Na-Boratpuffer {[0,5M Na-Borat, pH 9,5 + 0,5 mM EDTA) + 1% Triton X-100 + 10mM DTT + 50µg Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) per ml (frisch zugeben)]}.

Assay

3 fache Werte pro Probe: je 200µg

105µl Probe + 95µl Reaktionslösung

Lösungsansatz für 100 Assays:

10µl von 0,5 M Na-Borat, pH 9,5

5µl von 10 mM EDTA, pH 8

5µl von 100 mM CaCl₂

20µl von Dimethylcascein (10mg/ml) - Substrat

2,5µl von 10% Triton X-100

0,5µl 1M Dithiothreitol

2,8 µl von 100µM Putrescine

1µl [1,4(n) - ³H]Putrescine dihydrochloride

48,2 µl H₂O

Inkubation für 30 min bei 37 °C (unter Schütteln)

Die Reaktion wird mit 200 µl von 10% Trichloressigsäure + 0,1% Putrescine gestoppt.

Alle oben genannten Schritte wurden auf Eis gekühlt durchgeführt.

Der Filter wird zunächst mit H₂O angefeuchtet, dann wird das überschüssige H₂O abgesaugt.

Anschließend werden 0,5 ml (10% Trichloressigsäure + 0,1% Putrescine) als Vorlage auf dem Cellulose-Filter einpipettiert, um die Proteine auszufällen.

400 µl ausgefällte Proteinlösung wird entnommen und auf Cellulose-Filter (Whatman) übertragen.

Waschprozedur (wieder eisgekühlt):

1,10% Trichloressigsäure + 0,10% Putrescine (ca. 6 ml / Filter)

2,50% Trichloressigsäure + 0,05% Putrescine (ca. 6 ml / Filter)

3,95% Ethanol (ca. 6 ml / Filter)

Nach dem Waschen werden die Filter ins Szintillationsgefäß gegeben und mit 4,0 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt.

Die Proben werden zum Abklingen der Autofluoreszenz zunächst für 60h stehen gelassen und dann im Szintillationszähler gezählt.

3. Ergebnisse

3.1 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie der Wildtyp- und mit CATD retransfizierten Fibroblasten sowie HaCat-Zellen

In vorhergehenden Arbeiten wurde gezeigt, dass CATD an der Regulation der Transglutaminase 1 und somit an der terminalen Differenzierung der Haut beteiligt ist (Egberts et al., 2004). Damit die genannten Enzyme interagieren können, muss auch eine räumliche Nähe vorhanden sein. Daher sollte zuerst die räumliche Verteilung der verschiedenen Transglutaminasen in den Zellen in Bezug auf CATD dargestellt werden. Hierzu wurde die Methode der konfokalen Mikroskopie verwendet.

Chen et al. (2000b) zeigten, dass es nach Stimulation mit TNF- α zu einem Anstieg der Transglutaminase-Aktivität kam. Das Zytokin TNF- α wurde hier eingesetzt, um eine eventuell auftretende räumliche Veränderung der Transglutaminase-Lokalisation unter Stimulation mit TNF- α nachzuweisen, sowie zur Überprüfung, ob es zu einer Kolokalisation von Transglutaminase und CATD unter Stimulation mit TNF- α kommt.

3.1.1 Transglutaminase 1 und CATD

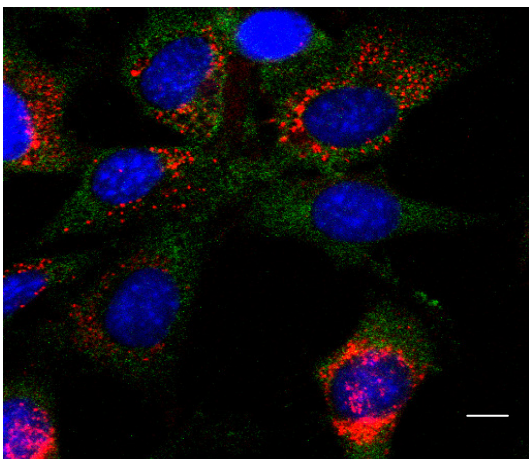
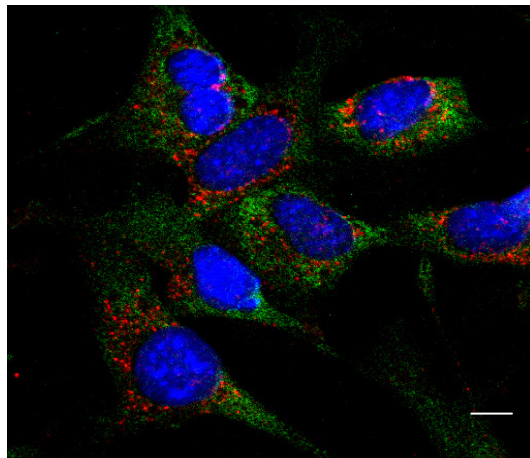
Zur Untersuchung der Kolokalisation von Transglutaminase 1 und CATD in den Wildtyp-Fibroblasten wurden beide Enzyme mit einem primären Antikörper aus unterschiedlichen Spezies markiert und mit einem speziesspezifischen fluorchrom-gekoppelten Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Transglutaminase 1 erscheint grün, CATD rot.

Bei dem Enzym TG1 war in den Wildtyp-Fibroblasten weder in der Kontrolle noch nach Stimulation mit TNF- α eine Kolokalisation mit CATD nachweisbar (Abb. 2), wo hingegen in den mit CATD retransfizierten Fibroblasten bereits eine Kolokalisation von TG1 und CATD in der Kontrolle und verstärkt nach Stimulation mit TNF- α (60 Min) dargestellt werden konnte, wie anhand der gelben Färbung zu sehen ist (Abb. 3). In den HaCat-Zellen konnte eine Kolokalisation von TG1 und CATD nach Stimulation mit TNF- α (60 Min.) beobachtet werden (Abb. 4). TG1 zeigte in den Fibroblasten und HaCat-Zellen sowohl eine zytosolische als auch membranständige Verteilung. CATD war größtenteils perinukleär im Golgiapparat lokalisiert. Die verwendeten primären und sekundären Antikörper bei der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie befinden sich als tabellarische Zusammenfassung im Anhang. Die Kerne wurden jeweils mit 'ProLong[®] Gold antifade reagent with DAPI', welches die DNA der Kerne färbt, sichtbar gemacht (Abb. 2-10) (weißer Balken entspricht jeweils 10 μ m)

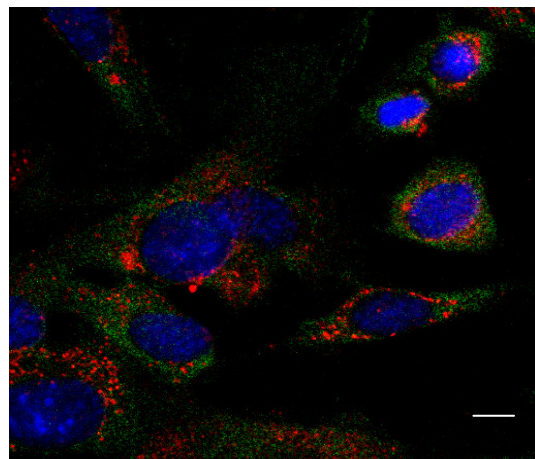
3.1.1.1 TG1 und CATD in Wildtyp-Fibroblasten

Weder in der unbehandelten Kontrolle noch in den mit TNF- α stimulierten Wildtyp-Fibroblasten ist eine gelbe Fluoreszenz, welche für eine Kolo­kalisation sprechen würde, nachweisbar.

Kontrolle



TNF – 30 min



TNF – 60 min

Abb.2: Keine Kolo­kalisation von TG1 (grün) und CATD (rot) in den Wildtyp-Fibroblasten, weder konstitutiv, noch nach Stimulation mit TNF- α . Primärer Anti-TG1-AK von Abcam (ab19936) mouse monoclonal + sekundärer AF-488 donkey anti-mouse-AK (grün), sowie primärer Anti-CATD-AK (R&D Systems) polyclonal goat anti-mouse + sekundärer AF-555 donkey anti-goat-AK (rot). Größenbalken: 10 μ m

3.1.1.2 TG1 und CATD in mit CATD retransfizierten Fibroblasten

Zur Untersuchung der Kolokalisation von Transglutaminase 1 und CATD in den mit CATD retransfizierten Fibroblasten wurden beide Enzyme mit einem primären Antikörper aus unterschiedlichen Spezies markiert und mit einem speziesspezifischen fluorchromgekoppelten Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Transglutaminase 1 erscheint grün, CATD rot. Bereits konstitutiv erscheint eine gelbe Fluoreszenz, welche sich nach der Stimulation mit TNF- α verstärkt. Dies deutet auf eine Kolokalisation von Transglutaminase 1 und CATD in den mit CATD retransfizierten Fibroblasten hin.

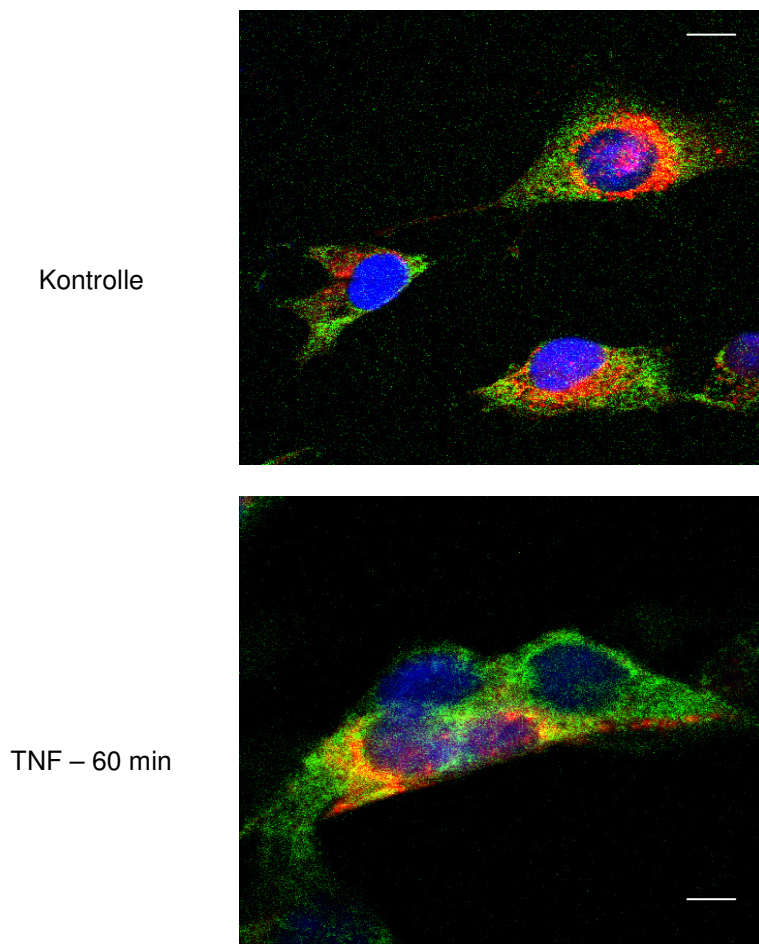
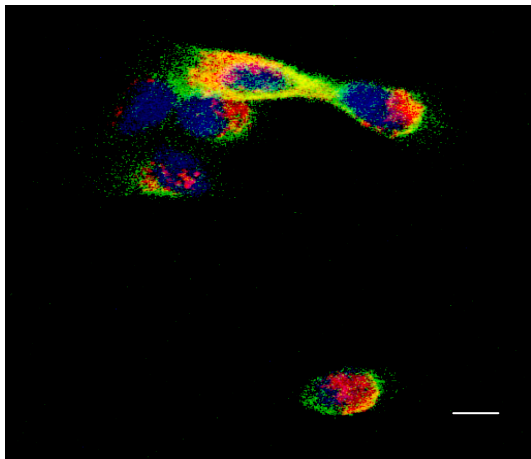
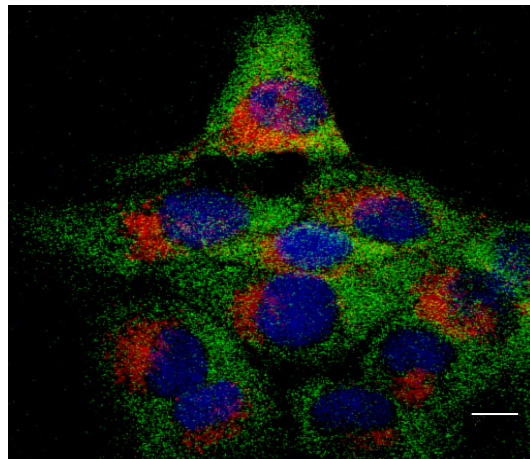


Abb.3: Kolokalisation (gelb) von TG1 (grün) und CATD (rot) in den retransfizierten Fibroblasten bereits konstitutiv und verstärkt nach Stimulation mit TNF- α . Primärer Anti-TG1-AK von Abcam (ab19936) mouse monoclonal + sekundärer AF-488 donkey anti-mouse-AK (grün), sowie primärer Anti-CATD-AK (Calbiochem) rabbit polyclonal against human + sekundärer AF-555 donkey anti-rabbit-AK (rot). Größenbalken: 10 μ m

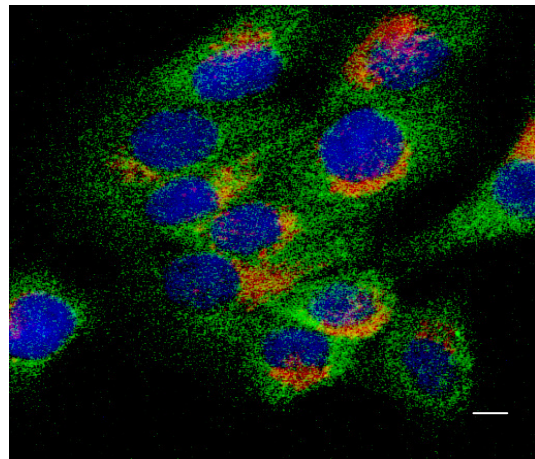
3.1.1.3 TG1 und CATD in HaCat-Zellen

Nach einer Stimulationszeit von 60 min mit TNF- α erscheint eine gelbe Fluoreszenz, welche auf eine Kolokalisation von Transglutaminase 1 und CATD hinweist. Diese Kolokalisation ist konstitutiv nicht nachweisbar.

Kontrolle



TNF – 60 min



TNF – 180 min

Abb.4: Kolokalisation (gelb) von TG1 (grün) und CATD (rot) in HaCat-Zellen nach Stimulation mit TNF- α (60 Min.). Primärer Anti-TG1-AK von Abcam (ab19936) mouse monoclonal + sekundärer AF-488 donkey anti-mouse-AK (grün), sowie primärer Anti-CATD-AK (Calbiochem) rabbit polyclonal against human + AF-555 donkey anti-rabbit-AK (rot). Größenbalken: 10 μ m

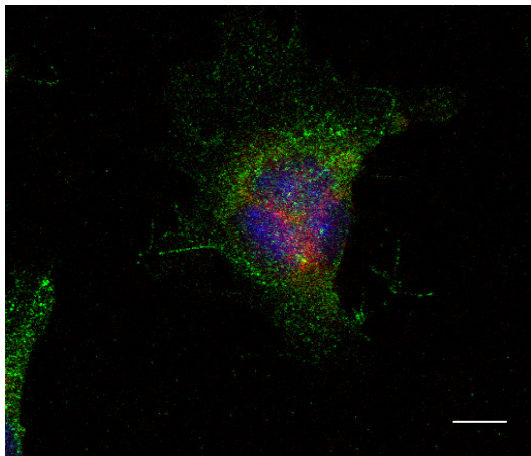
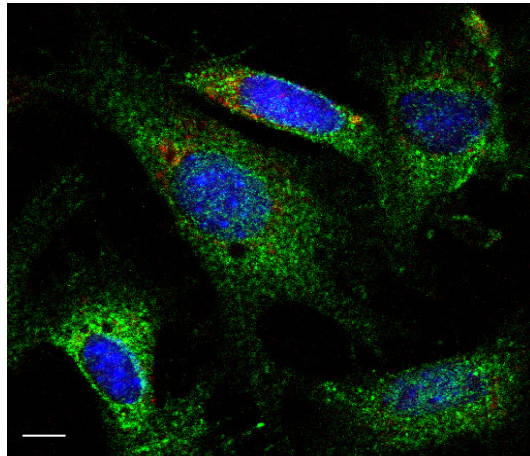
3.1.2 Transglutaminase 2 und CATD

Das Enzym TG2 zeigte in den Wildtyp-Fibroblasten eine schwache konstitutive Kolokalisation mit CATD, die nach 60 Min. TNF- α -Stimulation verstärkt auftritt (Abb. 5). In den mit CATD retransfizierten Fibroblasten war bereits konstitutiv eine ausgeprägte Kolokalisation mit CATD nachweisbar (Abb. 6). In den HaCat-Zellen zeigte sich erst eine Kolokalisation von TG2 und CATD nach Stimulation mit TNF- α , aber nicht konstitutiv (Abb. 7). Die TG2 Verteilung war fast identisch mit der von TG1, allerdings scheint die TG2 in den Fibroblasten sowie in den HaCat-Zellen mehr zytosolisch lokalisiert zu sein. Erst nach Stimulation mit TNF- α (60 Min.) kam es bei den Wildtyp-Fibroblasten zu einer teilweisen Umverteilung des Enzyms in die Zellmembran (Abb. 5), bei den HaCat-Zellen konzentrierte sich TG2 nach Stimulation mit TNF- α perinukleär (Abb. 7).

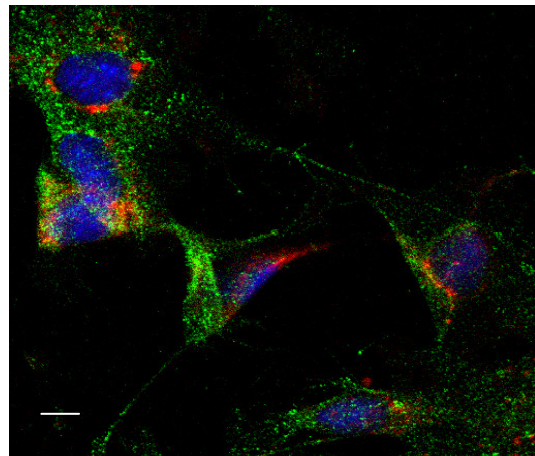
3.1.2.1 TG2 und CATD in Wildtyp-Fibroblasten

Zur Untersuchung der Kolokalisation von Transglutaminase 2 und CATD in den Wildtyp-Fibroblasten wurden beide Enzyme mit einem primären Antikörper aus unterschiedlichen Spezies markiert und mit einem speziesspezifischen fluorchrom-gekoppelten Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Transglutaminase 2 erscheint rot, CATD violett. Zur besseren Unterscheidung der beiden Rottöne wurde die Fluoreszenz mit der Wellenlänge 555 nm, also Transglutaminase 2 am LSM in die Farbe Grün gewechselt. Konstitutiv zeigt sich eine schwache gelbe Fluoreszenz, die nach Stimulation mit TNF- α (60 Min.) verstärkt auftritt und somit auf eine Kolokalisation von Transglutaminase 2 und CATD hinweist.

Kontrolle



TNF – 30 min



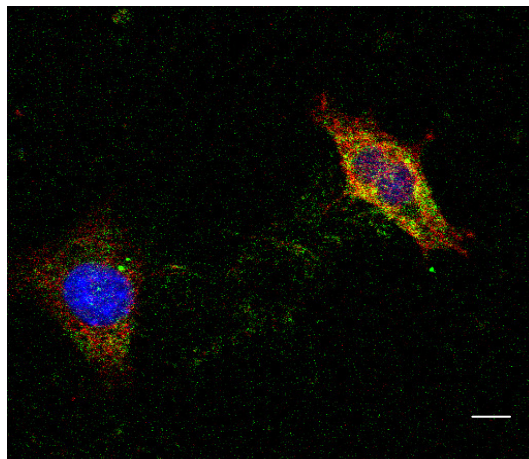
TNF – 60 min

Abb.5: Kolokalisation (gelb) von TG2 (grün) und CATD (rot) in den Wildtyp-Fibroblasten nach Stimulation mit TNF- α . Schwache Kolokalisation von TG2 und CATD in der Kontrolle. Primärer Anti-TG2-AK von Labvision (Ab-4) rabbit polyclonal + sekundärer AF-555 donkey anti-rabbit-AK (rot) sowie primärer Anti-CATD-AK (R&D Systems) polyclonal goat against mouse + sekundärer AF-633 donkey anti-goat-AK (violett). Veränderung der Farbe mit der Wellenlänge 555 nm (Transglutaminase 2) am LSM in die Farbe Grün zur besseren Unterscheidung der beiden Rottöne. Größenbalken: 10 μ m

3.1.2.2 TG2 und CATD in mit CATD retransfizierten Fibroblasten

Bereits konstitutiv lässt sich eine gelbe Fluoreszenz nachweisen, welche sich nach Stimulation mit TNF- α (60 Min.) verstärkt und somit auf eine Kolokalisation von Transglutaminase 2 und CATD hinweist.

Kontrolle



TNF – 60 min

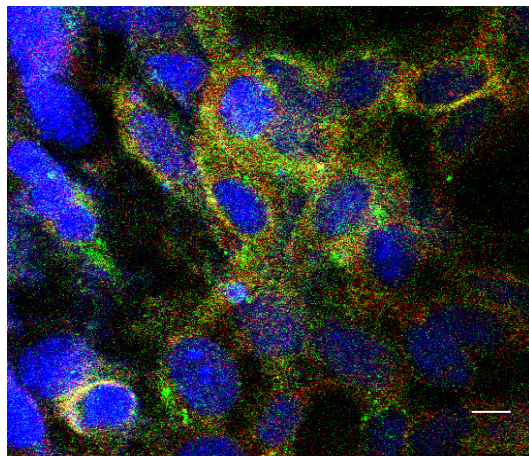
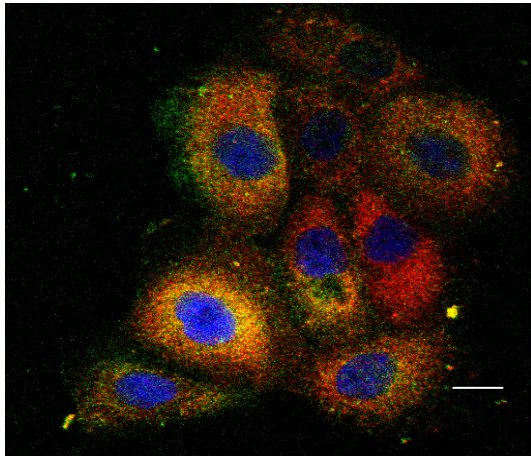
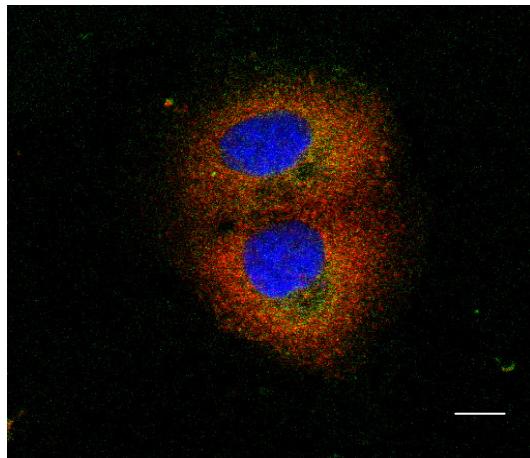


Abb.6: Kolokalisation (gelb) von TG2 (rot) und CATD (grün) in den mi CATD retransfizierten Fibroblasten bereits konstitutiv und verstärkt nach Stimulation mit TNF- α . Primärer Anti-TG2-AK von Labvision (Ab-4) rabbit polyclonal + sekundärer AF-555 donkey anti-rabbit-AK (rot), sowie primärer Anti-CATD-AK (Santa Cruz/E7) mouse monoclonal against human + sekundärer AF-488 donkey anti-mouse-AK (grün). Größenbalken: 10 μ m

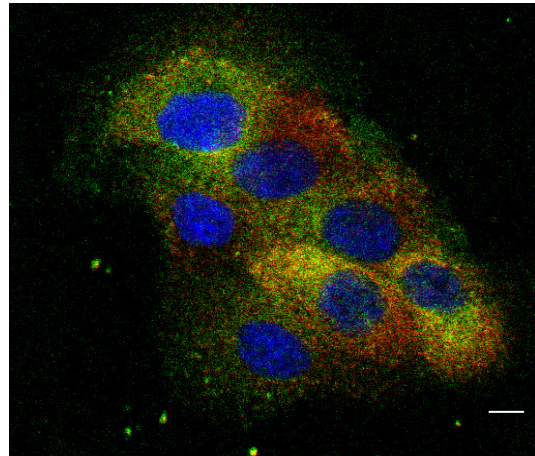
3.1.2.3 TG2 und CATD in HaCat-Zellen

Nach einer Stimulationszeit von 60 min mit TNF- α erscheint eine gelbe Fluoreszenz, welche auf eine Kolokalisation von Transglutaminase 2 und CATD hinweist. Diese Kolokalisation ist konstitutiv nicht nachweisbar.

Kontrolle



TNF – 60 min



TNF - 120 min

Abb.7: Kolokalisation (gelb) von TG2 (rot) und CATD (grün) in den HaCat-Zellen nach Stimulation mit TNF- α (60 Min.). Primärer Anti-TG2-AK von Labvision (Ab-4) rabbit polyclonal + sekundärer AF-555 donkey anti-rabbit-AK (rot), sowie primärer Anti-CATD-AK (Santa Cruz/E7) mouse monoclonal against human + sekundärer AF-488 donkey anti-mouse-AK (grün).
Größenbalken: 10 μ m

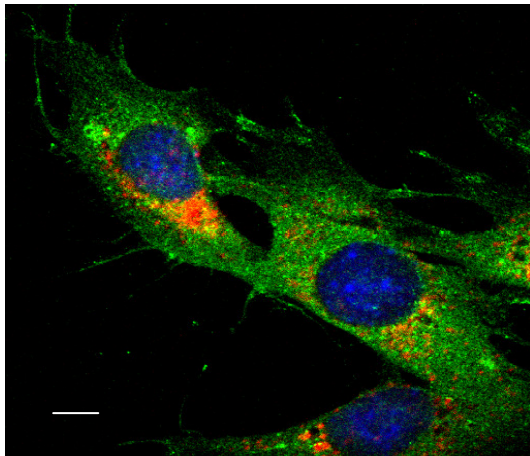
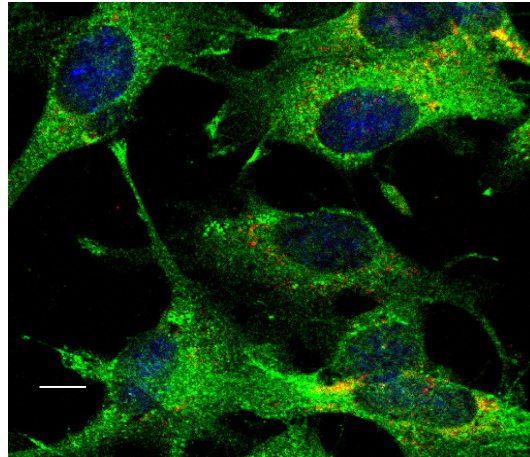
3.1.3 Transglutaminase 3 und CATD

Die TG3 zeigte bereits konstitutiv eine Kolokalisation mit CATD in den Wildtyp- und mit CATD retransfizierten Fibroblasten, welche sich nach Stimulation mit TNF in den Wildtyp-Fibroblasten verstärkte (Abb. 8), in den CATD-retransfizierten Fibroblasten jedoch zu keiner wesentlichen Veränderung führte. In den HaCat-Zellen zeigte sich konstitutiv auch eine Kolokalisation von TG3 und CATD, welche sich nach Stimulation mit TNF jedoch nicht wesentlich veränderte (Abb. 10). Die Verteilung der TG3 in den Fibroblasten erscheint membranständig und zytosolisch, wobei es nach Stimulation mit TNF zu einer vermehrten Translokation von TG3 in perinukleäre Regionen kommt (Abb. 8 und 9). In den HaCat-Zellen hingegen scheint die TG3 zytosolisch und perinukleär lokalisiert zu sein (Abb. 10).

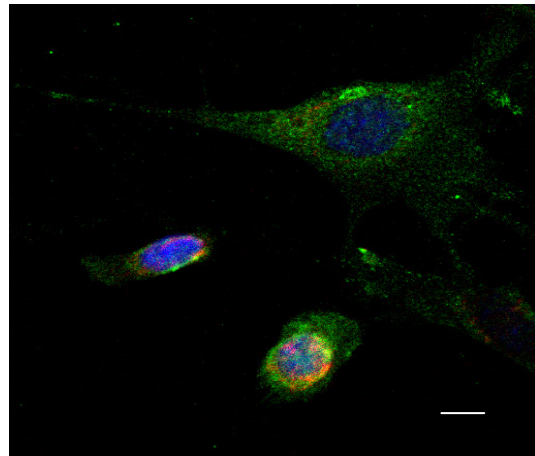
3.1.3.1 TG3 und CATD in Wildtyp-Fibroblasten

Bereits konstitutiv erscheint eine gelbe Fluoreszenz, welche sich nach der Stimulation mit TNF- α verstärkt. Dies deutet auf eine Kolokalisation von Transglutaminase 3 und CATD in den Wildtyp-Fibroblasten hin. Nach Stimulation mit TNF- α (30 Min.) kommt es zu einer Zunahme der Kolokalisation.

Kontrolle



TNF – 30 min



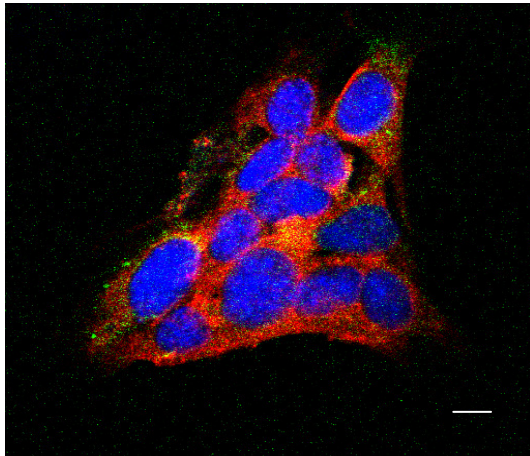
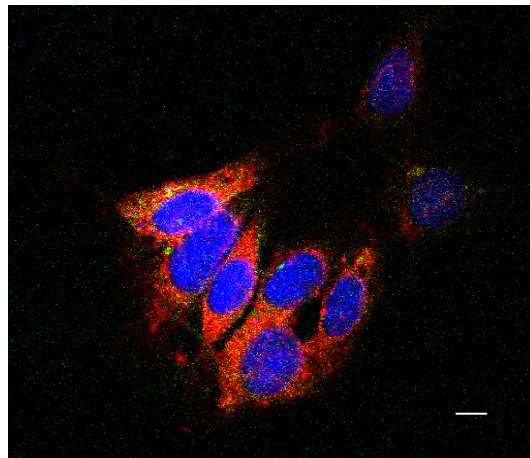
TNF – 60 min

Abb.8: Kolokalisation (gelb) von TG3 (grün) und CATD (rot) bereits konstitutiv und verstärkt nach Stimulation mit TNF- α (30 Min.) Primärer Anti-TG3-AK von Abcam (ab27001) rabbit polyclonal + sekundärer AF-555 donkey anti-rabbit-AK (rot), sowie primärer Anti-CATD-AK (R&D Systems) polyclonal goat against mouse + sekundärer AF-633 donkey anti-goat-AK (violett). Veränderung der Farbe mit der Wellenlänge 555 nm (Transglutaminase 3) am LSM in die Farbe Grün zur besseren Unterscheidung der beiden Rottöne. Größenbalken: 10 μ m

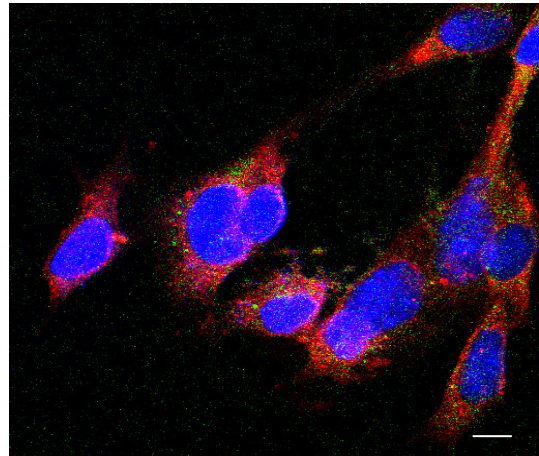
3.1.3.2 TG3 und CATD in mit CATD retransfizierten Fibroblasten

Bereits konstitutiv kommt es zu einer gelben Fluoreszenz, was auf eine Kolokalisation von TG3 und CATD hindeutet. Nach Stimulation mit TNF- α kommt es zu keinem wesentlichen Anstieg der Kolokalisation.

Kontrolle



TNF – 30 min

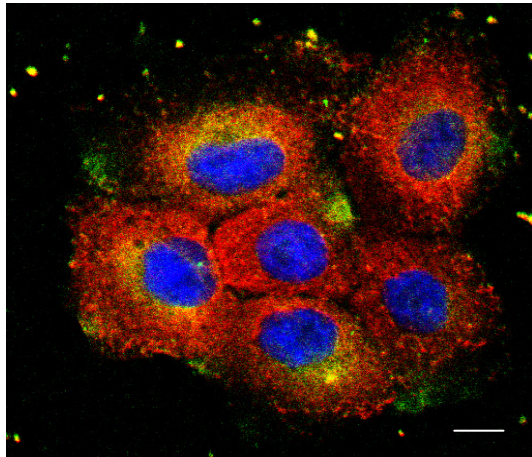


TNF – 60 min

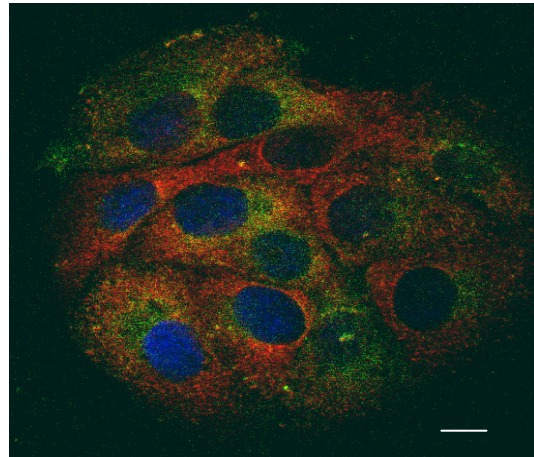
Abb.9: Kolokalisation (gelb) von TG3 (rot) und CATD (grün) bereits konstitutiv. Keine wesentliche Änderung nach Stimulation mit TNF- α . Primärer Anti-TG3-AK von Abcam (ab27001) rabbit polyclonal + sekundärer AF-555 donkey anti-rabbit-AK (rot), sowie primärer Anti-CATD-AK (Santa Cruz/E7) mouse monoclonal against human + sekundärer AF-488 donkey anti-mouse-AK (grün). Größenbalken: 10 μ m

3.1.3.3 TG3 und CATD in HaCat-Zellen

Bereits konstitutiv kommt es zu einer gelben Fluoreszenz, was auf eine Kolokalisation von TG3 und CATD hindeutet. Nach Stimulation mit TNF- α kommt es zu keinem wesentlichen Anstieg der Kolokalisation



Kontrolle



TNF – 60 min

Abb.10: Kolokalisation (gelb) von TG3 (rot) und CATD (grün) bereits konstitutiv. Keine wesentliche Veränderung nach Stimulation mit TNF- α . Primärer Anti-TG3-AK von Abcam (ab27001) rabbit polyclonal + sekundärer AF-555 donkey anti-rabbit-AK (rot), sowie primärer Anti-CATD-AK (Santa Cruz/E7) mouse monoclonal against human + sekundärer AF-488 donkey anti-mouse-AK (grün). Größenbalken: 10 μ m

3.2 Nachweis der Transglutaminasen im Westernblot

Aufgrund der durch die konfokale Laserscanning-Mikroskopie sichtbar gemachten deutlichen Kollokalisierung von CATD und Transglutaminasen, besonders nach Stimulation mit TNF- α , ergab sich die Frage, ob Cathepsin D einen Einfluss auf die Aktivität der Transglutaminasen hat. Da CATD eine Protease ist, sollte die Aktivierung der Transglutaminasen durch eine Prozessierung der Proteine mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Die Auswertung erfolgte durch die Software Aida Image Analyzer V.4.04 von Raytest mit der die Banden relativ quantifiziert werden können. Als 100% wurde die Basalexpression des jeweiligen Proteins ohne TNF- α -Stimulation festgelegt

3.2.1 Transglutaminase 1

A) TG1 in Wildtyp-Fibroblasten

In den Wildtyp-Fibroblasten war im Westernblot eine zunehmende Abnahme der 90 kDa-Isoform der TG1 nach Stimulation mit TNF- α über 24 – 48h nachweisbar. Der verwendete Anti-TG1-AK zeigte nur die 90 kDa-Isoform an.

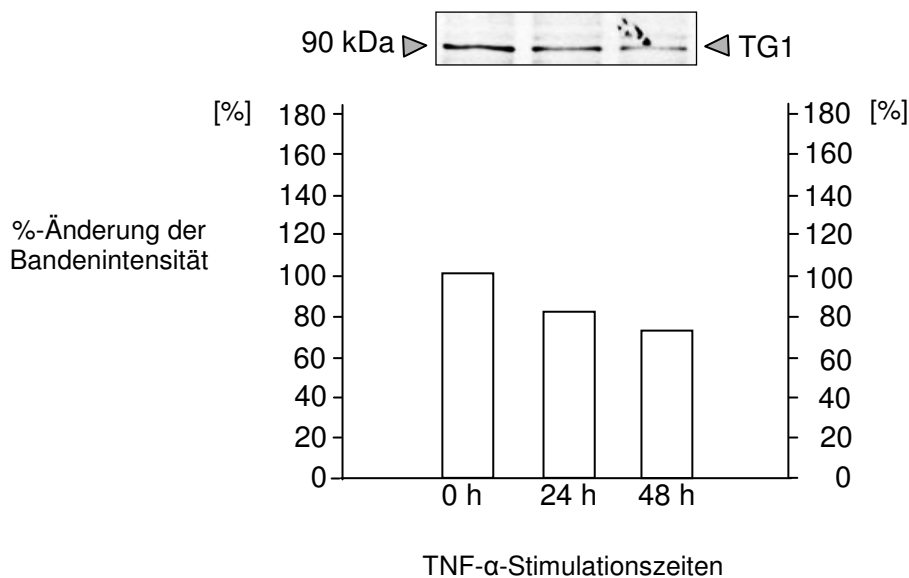


Abb. 11: Abnahme der 90 kDa-Isoform der TG1 in den Wildtyp-Fibroblasten nach Stimulation mit TNF- α im Vergleich zur Kontrolle (0h). Primärer Anti-TG1-AK von Abcam (ab19936) mouse monoclonal + sekundärer POD-gekoppelter rabbit anti-mouse-AK (dianova).

B) TG1 in HaCat-Zellen

In den HaCat-Zellen kam es ebenfalls zu einer zunehmenden Abnahme der 90 kDa-Isoform der TG1 nach Stimulation mit TNF- α über 2 - 24h. Der verwendete Anti-TG1-Ak zeigte auch hier nur die 90 kDa-Isoform der TG1 an.

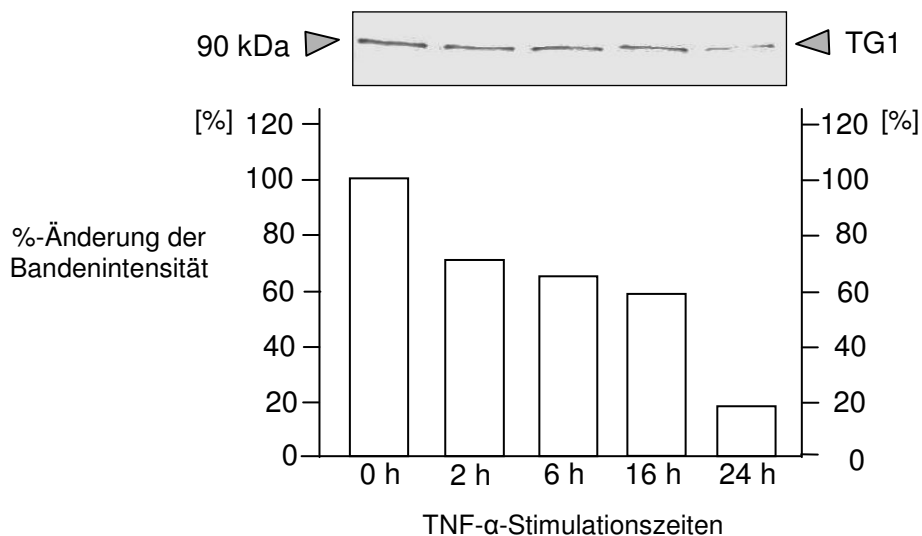


Abb. 12: Abnahme der 90 kDa-Isoform der TG1 in den humanen Keratinozyten nach Stimulation mit TNF- α im Vergleich zur Kontrolle (0h). Primärer Anti-TG1-AK von Abcam (ab19936) mouse monoclonal + sekundärer POD-gekoppelter rabbit anti-mouse-AK (dianova).

3.2.2 Transglutaminase 2

A) TG2 in Wildtype-, CATD-defizienten- und mit CATD retransfizierten Fibroblasten

In den Wildtype-Fibroblasten konnte eine Zunahme der 74 kDa – und der 55 kDa-Isoform der TG2 nach Stimulation mit TNF- α über 24 – 48h beobachtet werden. In den CATD-defizienten Fibroblasten blieb die 74 kDa-Isoform der TG2 fast konstant, während es zu einer Abnahme der 55 kDa-Isoform der TG2 nach Stimulation mit TNF- α über 24 – 48h kam. Die mit CATD retransfizierten Fibroblasten zeigten eine Mischbild aus den Wildtype- und den CATD-defizienten Fibroblasten, da es hier zu keiner wesentlichen Veränderung der 74 kDa-Isoform der TG2, wohl aber zu einer Zunahme der 55 kDa-Isoform der TG2 nach Stimulation mit TNF- α über 24 – 48h kam.

35 Ergebnisse

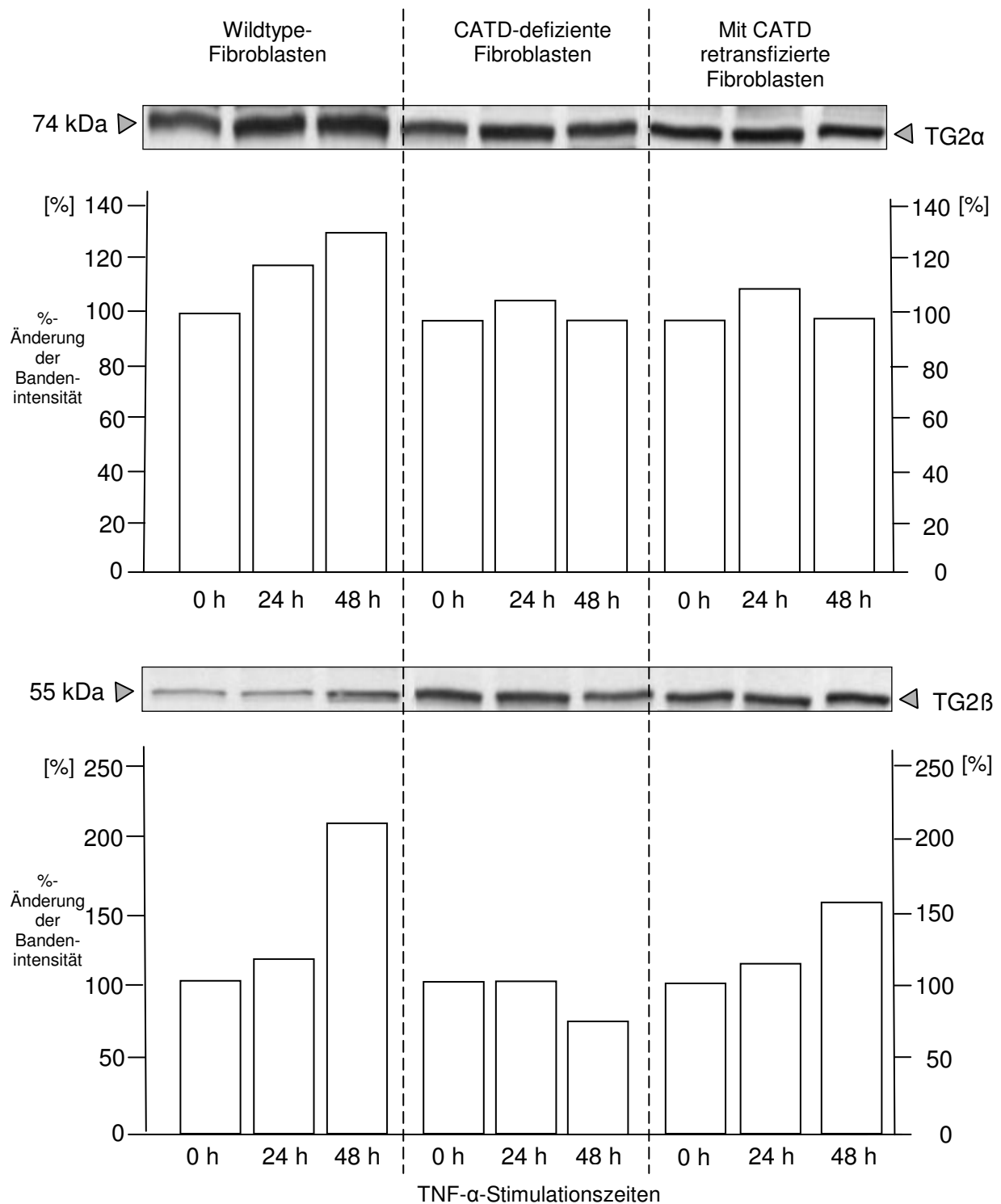


Abb. 13: Zunahme der 74 kDa- und der 55 kDa-Isoform der TG2 in den Wildtyp-Fibroblasten nach Stimulation mit TNF- α im Vergleich zur Kontrolle (0h). Abnahme der 55 kDa-Isoform der TG2 in den CATD-defizienten Fibroblasten nach Stimulation mit TNF- α . Zunahme der 55 kDa-Isoform der TG2 in den mit CATD retransfizierten Fibroblasten nach Stimulation mit TNF- α . Primärer Anti-TG2-AK von Labvision (Ab-4) rabbit polyclonal + sekundärer POD-gekoppelter goat anti-rabbit-AK (dianova).

B) TG2 in HaCat-Zellen

In den HaCat-Zellen kam es zu einer Abnahme der 74 kDa-Isoform und zu einer Zunahme der 55 kDa-Isoform unter Stimulation mit TNF- α über 2 – 24h.

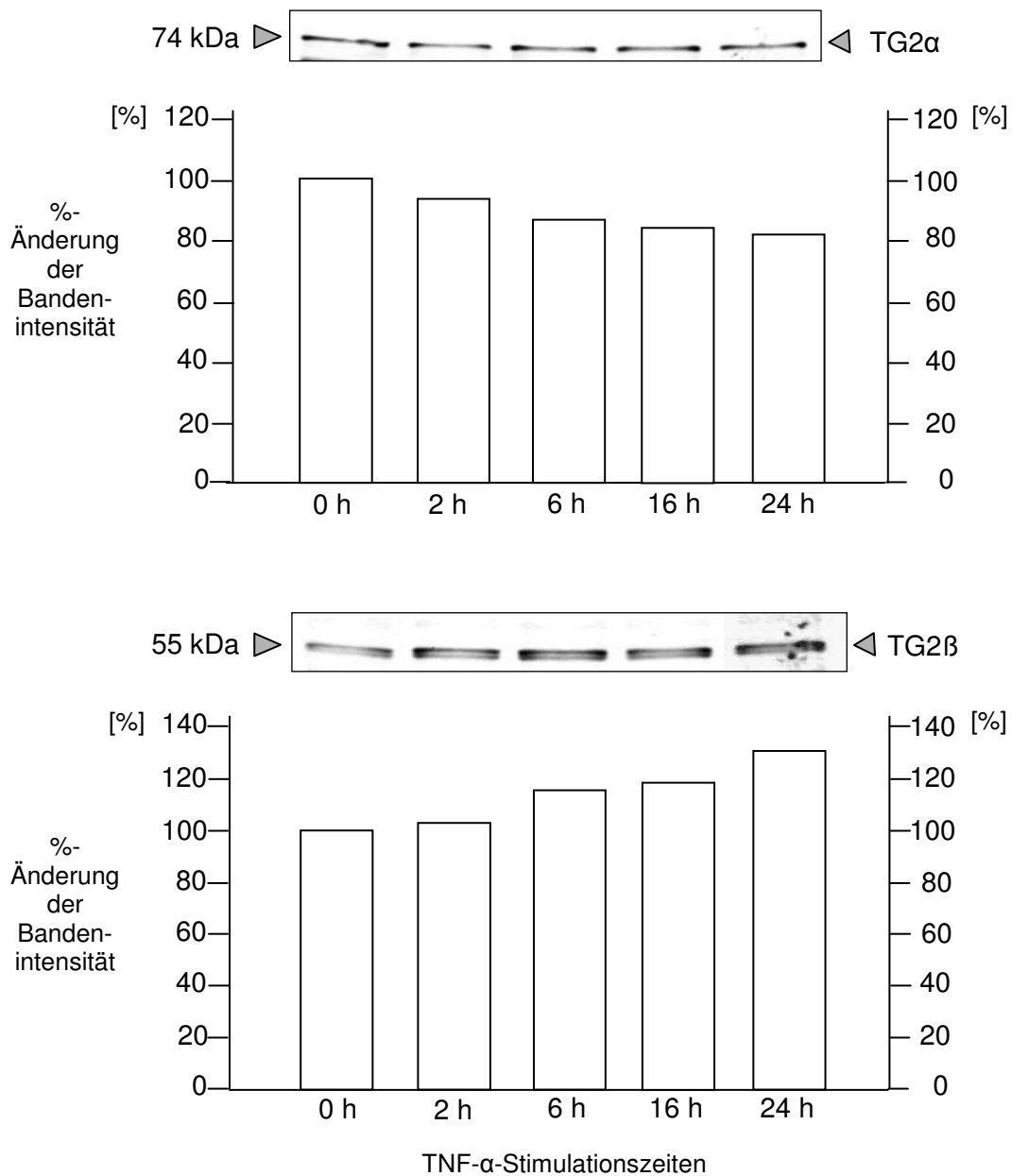


Abb. 14: Abnahme der 74 kDa-Isoform und Zunahme der 55 kDa-Isoform der TG2 in den humanen Keratinozyten nach Stimulation mit TNF- α im Vergleich zur Kontrolle (0h). Primärer Anti-TG2-AK von Labvision (Ab-4) rabbit polyclonal + sekundärer POD-gekoppelter goat anti-rabbit-AK (dianova).

3.2.3 Transglutaminase 3

A) TG3 in Wildtyp-Fibroblasten

In den Wildtype-Fibroblasten kam es zu einer Zunahme der 77 kDa-Isoform der TG3 nach Stimulation mit TNF- α über 16 – 48h.

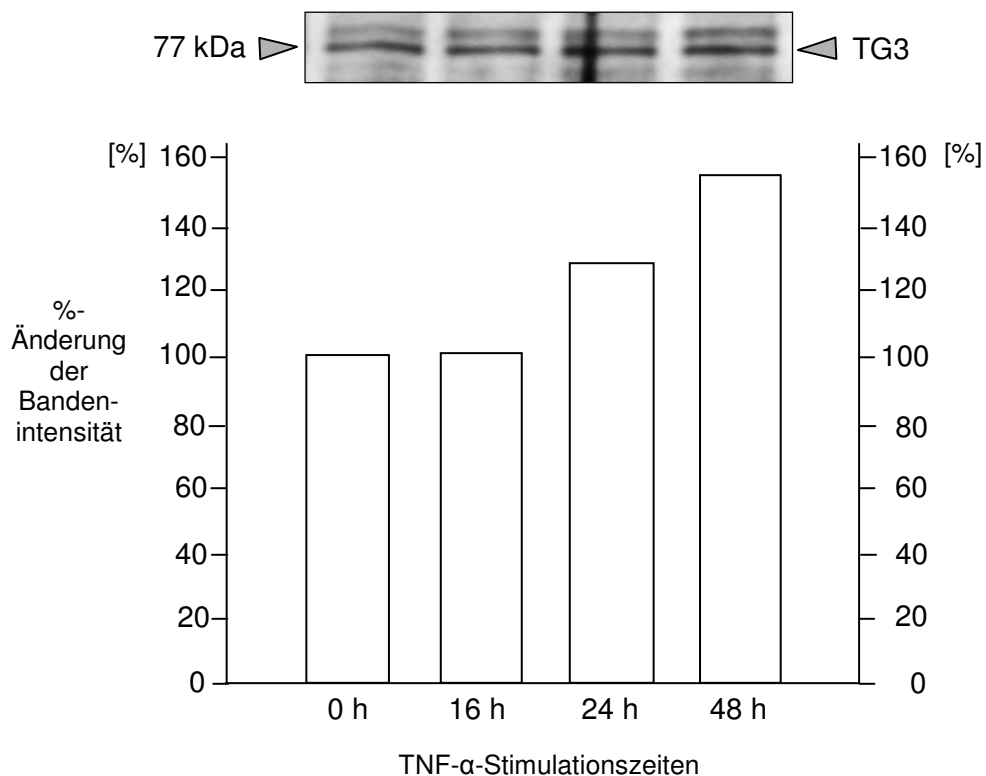


Abb. 15: Zunahme der 77 kDa-Isoform der TG3 in den Wildtyp-Fibroblasten nach Stimulation mit TNF- α im Vergleich zur Kontrolle (0h). Primärer Anti-TG3-AK von Abcam (ab27001) rabbit polyclonal + sekundärer POD-gekoppelter goat anti-rabbit-AK (dianova).

3.2.4 Cathepsin D

CATD in Wildtyp-, CATD-defizienten und mit CATD retransfizierten Fibroblasten

Zur Kontrolle des CATD-Gehaltes der verwendeten Zelllinien und der Auswirkung von TNF- α auf CATD wurden Westernblotanalysen mit CATD-Antikörpern durchgeführt.

In den Wildtyp-Fibroblasten kam es zu einer Abnahme der 48 kDa- und der 32 kDa-Isoform des CATD nach Stimulation mit TNF- α über 24 – 48h. In den CATD-defizienten Fibroblasten war kein CATD nachweisbar. In den mit CATD retransfizierten Fibroblasten kam es ebenfalls zu einer Abnahme der 48 kDa- und der 32 kDa-Isoform des CATD nach Stimulation mit TNF- α über 24 – 48h.

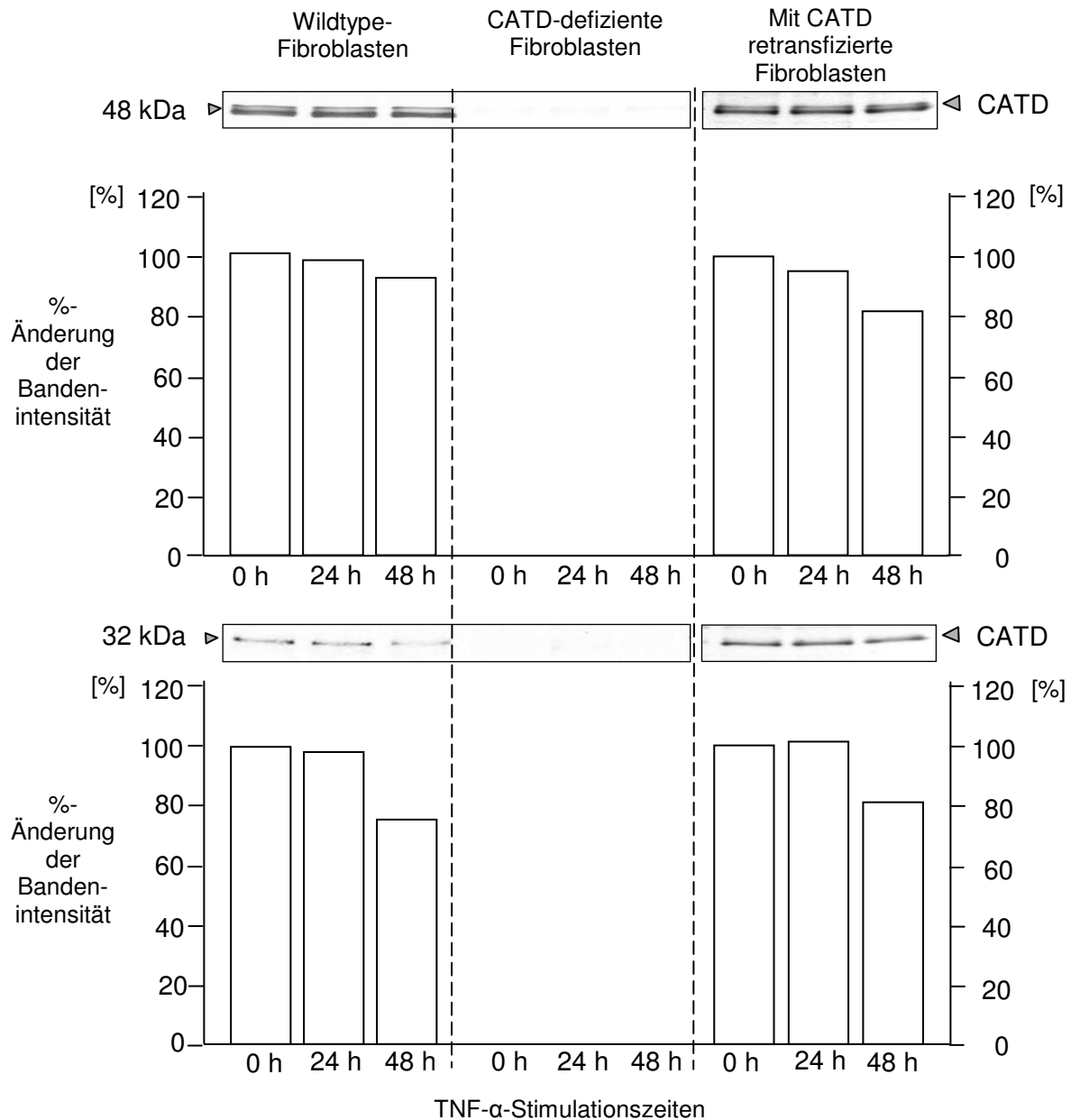


Abb. 16: Abnahme der 48 kDa- und der 32 kDa-Isoform des CATD bei den Wildtyp- und den mit CATD- retransfizierten Fibroblasten nach Stimulation mit TNF- α . Kein Nachweis von Cathepsin D in den CATD-defizienten Fibroblasten. Wildtyp- und CATD-defiziente Fibroblasten: primärer Anti-CATD-AK von Fr. Dr. Pohlmann (Universität Münster) rabbit polyclonal against mouse + sekundärer POD-gekoppelter goat anti-rabbit-AK (dianova). Mit CATD retransfizierte Fibroblasten: primärer Anti-CATD-AK (Calbiochem) rabbit polyclonal against human + sekundärer POD-gekoppelter goat anti-rabbit-AK (dianova).

3.3 Transglutaminaseaktivitäts-Assay

Zum Nachweis einer funktionellen Verbindung zwischen CATD und Transglutaminase wurden Transglutaminaseaktivitäts-Assays von Wildtyp-, CATD-defizienten- und mit CATD retransfizierten Fibroblasten unter Stimulation mit TNF- α durchgeführt.

Bei den Wildtyp- und den mit CATD retransfizierten Fibroblasten kam es nach Stimulation mit TNF- α über 16 – 48h zu einem deutlichen Anstieg der Transglutaminaseaktivität. Im Gegensatz dazu kam es bei den CATD-defizienten Fibroblasten zu keinem Anstieg der Transglutaminaseaktivität nach Stimulation mit TNF- α über 16 – 48h.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Protease CATD eine wichtige Funktion in dem durch TNF- α -induzierten Signalweg zur Aktivierung von Transglutaminasen hat.

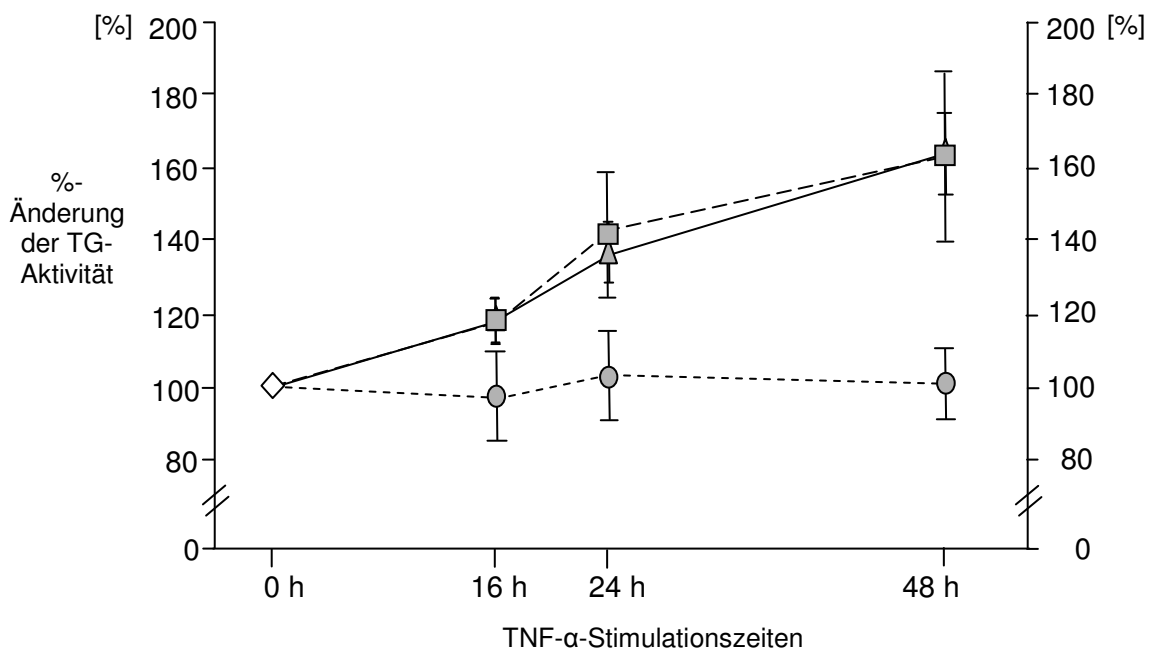


Abb. 17: Transglutaminaseaktivitäts-Anstieg in den Wildtyp- und mit CATD retransfizierten Fibroblasten, nach Stimulation mit TNF- α . Kein Anstieg der Transglutaminaseaktivität in den CATD-defizienten-Fibroblasten.

▲ Wildtyp-Fibroblasten ● CATD-defiziente-Fibroblasten ■ Mit CATD retransfizierte Fibroblasten ◇ Alle Fibroblasten (100% basale Aktivität)

3.4 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

	Wildtyp- Fibroblasten	CATD-defiziente Fibroblasten	Mit CATD retransfizierte Fibroblasten	HaCat Keratinocyten
	Maus-CATD	Maus-CATD	Humanes- CATD	Humanes-CATD
Kolokalisation				
TG1 / CATD				
Konstitutiv	-	-	+	-
Nach TNF	-	-	++	++
TG2 / CATD				
Konstitutiv	(+)	-	+	-
Nach TNF	++	-	++	+
TG3 / CATD				
Konstitutiv	+	-	+	+
Nach TNF	++	-	+	+
Westernblot				
TG1 – 90 kDa	Abnahme der 90 kDa-Bande nach TNF			Abnahme der 90 kDa-Bande nach TNF
TG2 – 74 kDa 55 kDa	Abnahme der 74 kDa-Bande, Zunahme der 55 kDa-Bande nach TNF	74 kDa-Bande gleichbleibend, Abnahme der 55 kDa-Bande nach TNF	74 kDa-Bande gleichbleibend, Zunahme der 55 kDa-Bande nach TNF	Abnahme der 74 kDa-Bande, Zunahme der 55 kDa-Bande nach TNF
TG3 – 77 kDa	Zunahme der Bande nach TNF			-
Anti-Maus-CATD (Pohlmann-AG) 52 kDa 48 kDa 32 kDa	Abnahme der 48 – und 32 kDa – Bande nach TNF	CATD nicht nachweisbar		
Anti-Human-CATD 52 kDa 48 kDa 32 kDa			Abnahme der 48 – und 32 kDa –Bande nach TNF	
TG-Aktivitätsassay Nach TNF	++	-	++	

Tab. 3: Zusammenfassung der Ergebnisse

Erläuterungen:

- Keine Kolokalisation, Bandenveränderung oder Aktivitätsanstieg
- (+) Geringfügige Kolokalisation vorhanden
- + Kolokalisation, Bandenveränderung bzw. Aktivitätsanstieg vorhanden
- ++ Starke Veränderungen z.B. Aktivitätsanstieg/Kolokalisation

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von Transglutaminasen (TG1, TG2 und TG3) mit Cathepsin D nach Stimulation mit TNF- α in Mausfibroblasten und humanen Keratinozyten untersucht.

Es wurde erstmals gezeigt, dass es nach Stimulation mit TNF- α in Mausfibroblasten und humanen Keratinozyten zu einer Kolokalisation von Transglutaminase 2 und Cathepsin D kommt (Abb. 5 und 7). Somit besteht zwischen diesen Enzymen ein durch TNF- α induzierbarer direkter räumlicher Kontakt. Weiterhin ist Cathepsin D notwendig für den durch TNF- α vermittelten Anstieg der Transglutaminaseaktivität:

Es kam zu einem deutlichen Anstieg der Aktivität nach Stimulation mit TNF- α in den Wildtyp-Fibroblasten und den mit CATD-retransfizierten Fibroblasten. Es kam zu keinem Anstieg der Transglutaminasenaktivität in den CATD-defizienten Fibroblasten.

In der konfokalen Mikroskopie zeigte sich eine Kolokalisation von Transglutaminase 1 und CATD in den mit CATD retransfizierten Fibroblasten bereits konstitutiv. In den humanen Keratinozyten, sowie in den mit CATD retransfizierten Fibroblasten kam es zu einer Verstärkung der Kolokalisation von TG1 und CATD nach der Stimulation mit TNF- α . Transglutaminase 2 und CATD zeigten auch bereits konstitutiv eine Kolokalisation in den mit CATD retransfizierten Fibroblasten. Nach Stimulation mit TNF- α kam es zu einer verstärkten Kolokalisation von TG2 und CATD in den Wildtyp- und mit CATD retransfizierten Fibroblasten sowie in den humanen Keratinozyten. Transglutaminase 3 und CATD kolokalisiert konstitutiv sowohl in den Wildtyp- und mit CATD retransfizierten Fibroblasten, als auch in den humanen Keratinozyten. Nach der Stimulation mit TNF- α kam es nur in den Wildtyp-Fibroblasten zu einer Verstärkung der Kolokalisation von TG3 und CATD.

Die Westernblot-Analyse zeigte eine Abnahme der 90 kDa-Isoform der Transglutaminase 1 in den Wildtyp-Fibroblasten und den humanen Keratinozyten nach Stimulation mit TNF- α . Dies deutet auf eine mögliche proteolytische Spaltung der TG1 nach Stimulation mit TNF- α hin.

Die Transglutaminase 2 zeigte eine Zunahme der 74 kDa-Isoform und der 55 kDa-Isoform nach Stimulation mit TNF- α in den Wildtyp-Fibroblasten und den humanen Keratinozyten. Anders verhielt es sich bei den CATD-defizienten- und den mit CATD retransfizierten Fibroblasten. Während die 74 kDa-Isoform der TG2 bei beiden Zelltypen nach Stimulation mit TNF- α kaum Veränderungen zeigte, kam es bei den CATD-defizienten Fibroblasten nach Stimulation mit TNF- α zu einer Abnahme der 55 kDa-Isoform der TG2, bei den mit CATD

retransfizierten Fibroblasten hingegen zu einer Zunahme der 55 kDa-Isoform. Nach diesen Untersuchungsergebnissen benötigt TG2 also CATD, damit die 55 kDa-Isoform durch TNF- α aktiviert werden kann.

Die Transglutaminase 3 zeigte nur in den Wildtyp-Fibroblasten eine Zunahme der 77 kDa-Isoform nach Stimulation mit TNF- α , hierbei handelt es sich um die nichtaktive Proform der TG3. TNF- α induziert nach unseren Erkenntnissen keine Prozessierung zur aktiven Form der TG3 auch kann kein Zusammenhang mit der Prozessierung der aktiven Isoform der TG3 mit der Expression von CATD hergestellt werden. Zu berücksichtigen bleibt, dass der verwendete Antikörper eventuell nicht in der Lage war die Spaltprodukte der 77 kDa-Isoform der TG3 im Westernblot zu erkennen.

Egberts et al. (2004) wiesen eine Aktivitätssteigerung der TG1 in Keratinozytenkulturen durch exogene Zugabe von CATD nach. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass CATD eine proteolytische Aktivierung des TG1 Vorläufermoleküls zu enzymatisch aktiven TG1 Fragmenten bewirkt. Daraufhin wurde in meiner Arbeit die Regulation von TG1 durch CATD mit Hilfe von CATD defizienten Mausfibroblasten überprüft.

Bei den Wildtyp-Fibroblasten konnte im Western-Blot eine starke 35 kDa-Bande (enzymatisch aktive Form der TG1) nachgewiesen werden. Diese Bande war in den CATD-defizienten Fibroblasten kaum nachweisbar, dafür zeigte sich die Expression eines 150 kDa Vorläuferproteins. Es wurde angenommen, dass die gestörte Prozessierung des 150 kDa TG1 Vorläuferproteins in den CATD-defizienten Fibroblasten eine funktionelle Rolle von CATD in der Reifung des 150 kDa Vorläufermoleküls zur enzymatisch aktiven 35 kDa Form zeigt. CATD-defiziente Mäuse zeigten neben der reduzierten Transglutaminase1-Aktivität auch reduzierte Proteinlevel von Involucrin, Loricrin, Filaggrin und den Keratinen K1 und K5. Diese Proteine sind mitbeteiligt an der Entstehung des CE.

Die Haut von CATD-defizienten Mäusen weist Ähnlichkeiten mit der humanen Hautkrankheit ‚lamelläre Ichthyose‘ auf (Egberts et al., 2004).

TG1-defiziente Mäuse zeigen eine beeinträchtigte Schutzfunktion der Haut aufgrund von Verhornungsstörungen (Matsuki et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen die Ergebnisse von Egberts et al. (2004) zu reproduzieren, zu erweitern und zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen CATD und Transglutaminase in der TNF-Signalkaskade besteht. Leider war der damals verwendete TG1-Antikörper (goat anti-human) von Kim et al. (1995), der in der Lage war alle Isoformen der Transglutaminase 1 zu erkennen, nicht mehr verfügbar. Der hier

verwendete Anti-TG1-Antikörper (ab 19936 / mouse anti-human) erkannte im Western-Blot nur die 90 kDa-Bande der Transglutaminase 1. Dies würde die abweichenden Ergebnisse dieser Arbeit zu den Ergebnissen von Egberts et al. (2004) erklären und eine Interaktion von TG1 und CATD nicht ausschließen. Es wäre möglich, dass eine Prozessierung der TG1 zu Isoformen stattgefunden hat, die der verwendete TG1-Antikörper im Westernblot nicht erkannt hat.

Bei der konfokalen Mikroskopie der Wildtyp-Fibroblasten war keine Kolo-kalisation von TG1 und CATD nachzuweisen. Dies könnte an dem verwendeten Anti-TG1-Antikörper (ab 19936/ mouse anti-human) gelegen haben, ein Anti-TG1-Antikörper (anti-mouse) war zu diesem Zeitpunkt nicht verfügbar. Der verwendete AK war möglicherweise nicht in der Lage Maus-CATD in der Fluoreszenzmikroskopie zu erkennen. Im Westernblot war dem AK der Nachweis der 90 kDa-Bande der TG1 möglich. Nach Stimulation mit TNF- α kam es zu einer Abnahme dieser Bande, was auf eine Prozessierung der TG1 zu Isoformen, die der Antikörper im Western-Blot nicht erkennt, hindeuten könnte.

Die Ergebnisse im Westernblot (Abb. 13) zeigen, dass es nur in Anwesenheit von CATD zu einer Zunahme der 55 kDa-Isoform der TG2, also TG2- β kommt. Dies bedeutet, dass CATD eine mögliche Bedeutung für die Aktivierung der TG2 hat.

Dies könnte von Bedeutung für entzündliche Hauterkrankungen, z.B. im Rahmen der Psoriasis sein, bei welcher in den hyperkeratotischen Läsionen die Abwesenheit von Cathepsin D beschrieben wurde (Chen et al., 2000c).

Im psoriatischen Plaque sind die Übergangszellschichten sowie das Stratum granulosum abgeschwächt ausgebildet. Die Organellen, wie der Kern, werden normalerweise in diesen Zellschichten, je weiter sie zur Hautoberfläche wandern, degradiert. Im psoriatischen Plaque bleiben die Kerne sogar bis zur Hornschicht erhalten.

Die terminale Differenzierung der Keratinozyten wurde auch als eine spezielle Form der Apoptose angesehen. Im psoriatischen Plaque würde dies also für eine pathologisch verminderte Apoptose sprechen.

Die Aktivierung von CATD erfolgt in den Lysosomen (Gieselmann et al., 1985). In der Haut besteht die grösste lysosomale Aktivität im Stratum granulosum, wo viele der intrazellulären Moleküle vor dem Verhornungsprozess degradiert werden.

Der psoriatische Plaque ist charakterisiert durch Hyperproliferation und einer frühzeitigen terminalen Differenzierung, so dass es nicht bzw. nur zu einer unvollständigen Ausbildung des Stratum granulosum kommt (Bernard et al., 1988).

Dies wäre eine weitere mögliche Erklärung warum Cathepsin D bei Psoriasis verringert exprimiert ist. Durch die geringere Ausprägung des Stratum granulosum, in dem sich die Lysosomen befinden, kann CATD nicht mehr aktiviert werden.

Bei Psoriasis sind die Bindekräfte der benachbarten Schuppen des Stratum corneum verändert, so dass es zu einer frühzeitigen Abschuppung kommt. In normaler Haut konnte gezeigt werden, dass CATD im Stratum corneum vorhanden und am Abschuppungsprozess beteiligt ist (Horikoshi et al., 1998, 1999). Im Stratum corneum der psoriatischen Haut hingegen war CATD nicht mehr nachweisbar (Chen et al., 2000c).

Hypothese zur Interaktion zwischen Cathepsin D und TG2 bei Psoriasis

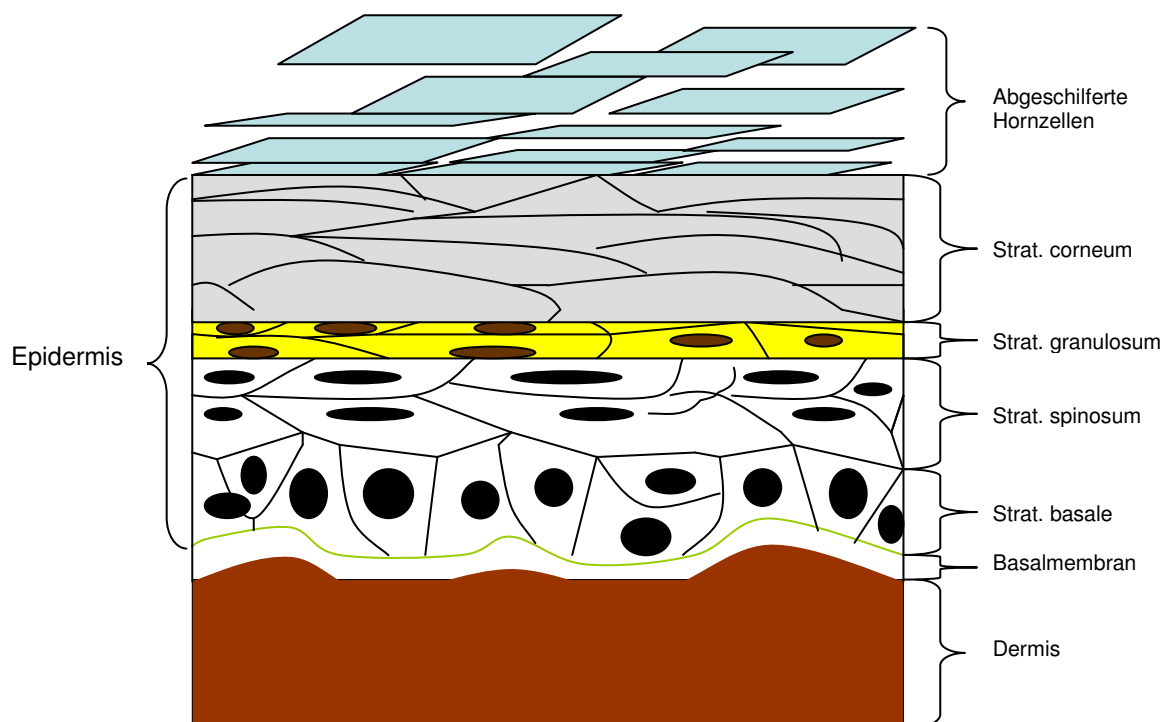


Abb. 18: Schematische Darstellung der menschlichen Haut im Querschnitt

Ausschnitte der Epidermis

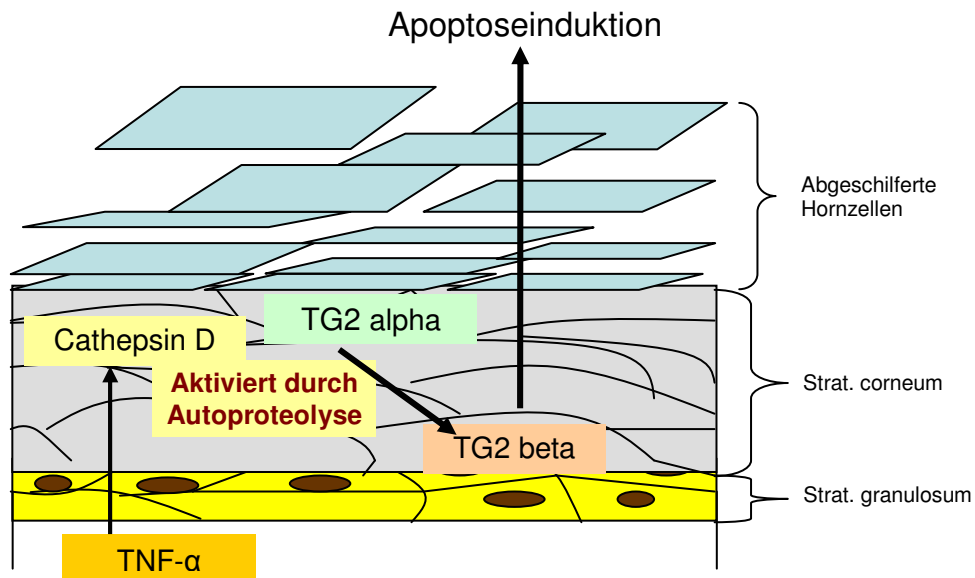


Abb. 19: Gesunde Haut: CATD bewirkt eine Zunahme von TG2-beta unter Stimulation mit TNF-α. TG2-beta fördert die Apoptose von Zellen.

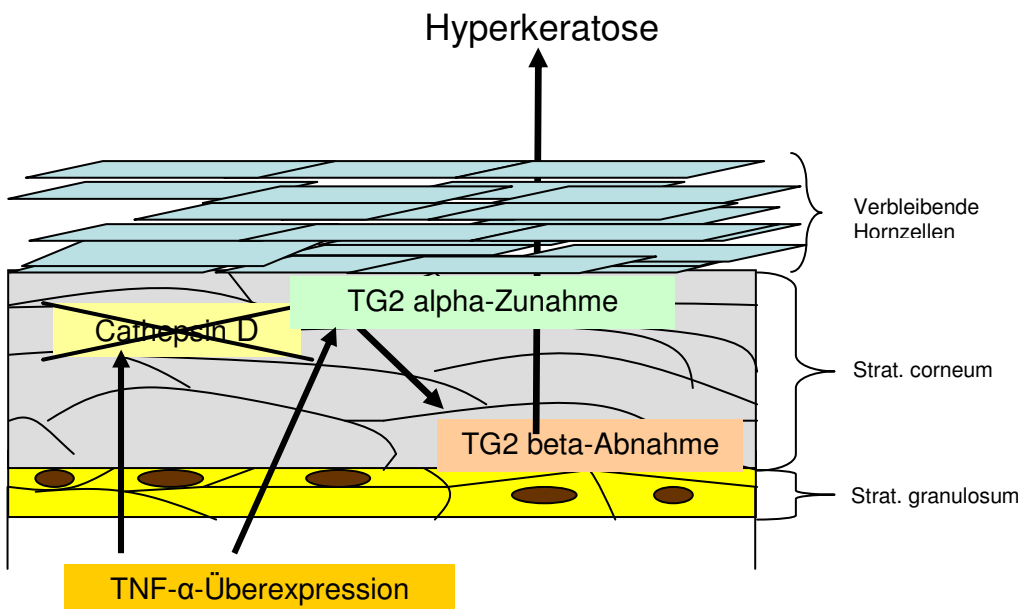


Abb. 20: Psoriatische Haut: Ein Mangel bzw. Fehlen von CATD führt zu einem Mangel an TG2-beta. Der TG2-alpha-Überschuss wirkt antiapoptotisch.

Aufgrund der in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse scheint Cathepsin D essentiell für die Aktivierung der Transglutaminase 2 zu sein.

Fraglich bleibt, welche der Transglutaminasen im Aktivitätsassay das dominante Enzym war, da bei dem Assay alle verschiedenen Transglutaminase-Typen erfasst werden.

Wie in diesen Experimenten (Abb. 16) gezeigt wird, nimmt die Cathepsin D-Expression unter Stimulation mit TNF- α über einen noch unbekannten Mechanismus ab.

Diese Beobachtung könnte eine weitere Erklärung für die abgeschwächte Expression von CATD bei Psoriasisläsionen sein, da der TNF- α Level bei den Patienten infolge autoimmuner Inflammation erhöht ist und diese Erhöhung von TNF- α insbesondere in Psoriasisläsionen nachweisbar ist (Ettehadi et al., 1994).

Bereits seit Mitte der 90er Jahre ist bekannt, dass im Stratum corneum von Psoriasisläsionen erhöhte TNF- α Spiegel zu finden sind (Ettehadi et al., 1994).

Die TG2 zeigt im Western Blot nach TNF- α Stimulation auch in diesen Experimenten in den Wildtyp-Fibroblasten und den mit humanem CATD retransfizierten Fibroblasten eine deutliche Zunahme der TG2- β -Isoform, während bei CATD-defizienten Fibroblasten TG2- α/β unter Stimulation mit TNF- α nicht zunimmt und im Gegenteil sogar die TG2- β -Isoform nach 48stündiger Stimulation mit TNF- α abnimmt.

Da CATD proteolytische Aktivität besitzt, und unbekannt ist welcher Mechanismus zur Spaltung von TG2 führt, liegt folgende Hypothese nahe: TG2- α wird durch CATD gespalten zur proapoptotischen TG2- β (Abb. 13 und 19). Im Kontext der Psoriasis könnte dies erklären, wie ein CATD-Mangel zu einer Hyperkeratose führt. Wird CATD durch einen unbekannten Mechanismus unter Stimulation mit TNF- α eliminiert (Abb. 16), so überwiegt die antiapoptotische TG2- α -Isoform, es findet keine Apoptoseinduktion mehr statt, im Gegenteil, die protektive Funktion der TG2- α überwiegt (Abb. 20). Dazu passend konnte gezeigt werden, dass die Inhibition aller Transglutaminasen zu Hyperkeratose führt (Harrison et al., 2007).

Boymann et al. (2004) nahmen an, dass die TNF- α -abhängige Aktivierung von ‚resident‘, also ortsansässigen T-Zellen notwendig und ausreichend für die Entwicklung von psoriatischen Läsionen ist.

Aktivierte T-Helferzellen sezernieren eine Reihe von unterschiedlichen Zytokinen, so unter anderem auch verschiedene Interleukine und TNF- α .

Die Ergebnisse dieser Arbeit beschreiben einen Effekt von TG2 und CATD in Fibroblasten. Ein CATD-defizientes Modell von Keratinozyten stand nicht zur Verfügung. Da allerdings die

humanen Keratinozyten (HaCat) in bezug auf die Transglutaminase 2 und CATD in der konfokalen Mikroskopie, sowie im Westernblot ähnliche Ergebnisse wie die Wildtyp- und mit CATD retransfizierten Fibroblasten zeigten, liegt die Vermutung nahe, dass dieser Effekt auch in CATD-defizienten humanen Keratinozyten zu beobachten wäre.

Die TG3 zeigte bereits konstitutiv eine Kolokalisation mit CATD in den Wildtyp- und retransfizierten Fibroblasten, welche sich nach Stimulation mit TNF- α in den Wildtyp-Fibroblasten verstärkte, in den mit CATD retransfizierten Fibroblasten jedoch zu keiner wesentlichen Veränderung führte. In den HaCat-Zellen zeigte sich konstitutiv auch eine Kolokalisation von TG3 und CATD, welche sich nach Stimulation mit TNF- α jedoch nicht wesentlich veränderte.

Im Westernblot kam es in den Fibroblasten zu einem Anstieg der 77 kDa-Bande nach Stimulation mit TNF- α (Abb. 15). In den HaCat-Zellen kam es zu keiner wesentlichen Veränderung der Banden (ohne Abbildung). In den Wildtyp-, wie auch in den CATD-defizienten Fibroblasten kam es zu einer Zunahme der 77 kDa-Bande nach Stimulation mit TNF- α . Wobei der Anstieg der 77 kDa-Bande in den CATD-defizienten Fibroblasten schwächer ausfällt. Hingegen kommt es in den mit CATD retransfizierten Fibroblasten zu einer Abnahme der 77 kDa-Bande. Diese Ergebnisse deuten eher darauf hin, dass CATD nicht direkt an der Aktivierung der TG3 beteiligt ist (Abb. 22 im Anhang).

Das lösliche Proenzym TG3 mit einer ungefähren Molekularmasse von 77 kDa (Chung and Folk, 1972) hat eine weitverbreitete Expression und ist wichtig für die Schutzschicht der Haut. Es ist ein Zymogen, welches erst durch proteolytische Spaltung zu 50 kDa und 27 kDa aktiviert wird (Kim et al., 1990). In der Haut wird TG3 anscheinend nur im oberen Stratum granulosum angetroffen.

Hitomi et al. (2003) hingegen meinen, dass TG3 nach proteolytischer Aktivierung in zwei Fragmente mit 47 kDa und 30 kDa umgewandelt wird welche über eine nichtkovalente Verbindung verbunden sind.

Kürzlich konnte von Cheng et al. (2006) gezeigt werden, dass Cathepsin L zumindest in vitro in der Lage ist TG3 zu spalten und somit zu aktivieren.

Bis heute sind keine Mutationen bzw. Erkrankungen bekannt, die mit der Transglutaminase 3 zusammenhängen.

In Zusammenschau der Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie, der Westernblotanalyse und der Ergebnisse des Enzymaktivitäts-Assays liegt die Vermutung nahe, dass Cathepsin D direkt die TNF- α vermittelte Aktivierung der TG2 reguliert.

5. Zusammenfassung

Egberts et al. (2004) wiesen eine Aktivitätssteigerung der TG1 in Keratinozytenkulturen durch exogene Zugabe von CATD nach. Daraufhin wurde die Regulation von TG1 durch CATD mit Hilfe von CATD defizienten Mausfibroblasten überprüft.

Es zeigte sich eine gestörte Prozessierung der TG1 in CATD-defizienten Fibroblasten. Daraus wurde geschlossen, dass die TG1 durch/über CATD vermittelte proteolytische Prozessierung aktiviert werden kann. Da von der Arbeitsgruppe Schütze, Institut für Immunologie, vorher gezeigt wurde, dass CATD durch TNF aktivierbar ist (Heinrich et al., 2004), wurde in der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen die Ergebnisse von Egberts et al. (2004) zu reproduzieren und darüber hinaus zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zur TNF-Signalkaskade besteht. Zusätzlich wurde untersucht, ob CATD auch einen Einfluss auf die Regulation der Transglutaminase 2 und 3 hat.

Dazu wurde für Kollokalisationsexperimente das Verfahren der konfokalen Mikroskopie, für die Analyse der Protein-Prozessierungen die Westernblotanalyse und zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Transglutaminaseaktivitäts-Assay eingesetzt.

Es wurde erstmals gezeigt, dass es nach Stimulation mit TNF- α in Mausfibroblasten und humanen Keratinozyten zu einer Kollokalisierung von Transglutaminase 2 und Cathepsin D kommt (Abb. 5 und 7). Somit besteht zwischen diesen Enzymen ein durch TNF- α induzierbarer direkter räumlicher Kontakt. Im Westernblot zeigte die Transglutaminase 2 eine Zunahme der 74 kDa-Isoform und der 55 kDa-Isoform nach Stimulation mit TNF- α in den Wildtypfibroblasten und den humanen Keratinozyten. Anders verhielt es sich bei den CATD-defizienten- und den mit CATD retransfizierten Fibroblasten. Während die 74 kDa-Isoform der TG2 bei beiden Zelltypen nach Stimulation mit TNF- α kaum Veränderungen zeigte, kam es bei den CATD-defizienten Fibroblasten nach Stimulation mit TNF- α zu einer Abnahme der 55 kDa-Isoform der TG2, bei den mit CATD retransfizierten Fibroblasten hingegen zu einer Zunahme der 55 kDa-Isoform.

Weiterhin ist Cathepsin D notwendig für den durch TNF- α vermittelten Anstieg der Transglutaminaseaktivität.

Die Ergebnisse im Westernblot (Abb. 13) zeigen, dass es nur in Anwesenheit von CATD zu einer Zunahme der 55 kDa-Isoform der TG2, also TG2- β kommt. Dies bedeutet, dass CATD eine essentielle Bedeutung für die Aktivierung der TG2 hat. Weiterhin kommt es nach Stimulation mit TNF- α in Mausfibroblasten und humanen Keratinozyten zu einer Kollokalisierung von Transglutaminase 2 und Cathepsin D (Abb. 5 und 7).

Dies könnte von Bedeutung für entzündliche Hauterkrankungen, z.B. im Rahmen der Psoriasis sein, bei welcher in den hyperkeratotischen Läsionen die Abwesenheit von Cathepsin D beschrieben wurde (Chen et al., 2000c).

Die Transglutaminase 2 (TG2) scheint in erster Linie an einer Vielzahl entzündlicher Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen beteiligt zu sein. Unter anderem Zöliakie, rheumathoider Arthritis, Multipler Sklerose, Diabetes mellitus Typ II und neurodegenerativer Erkrankungen (Facchiano et al., 2006). Sie wird in den basalen Schichten der Epidermis exprimiert, wo sie bei der Quervernetzung von Proteinen zur Stabilisierung der Extrazellulärmatrix beteiligt ist (Aeschlimann and Paulsson, 1991; Aeschlimann and Thomazy, 2000).

Es kommt zu einer Anreicherung von Transglutaminase 2 in Zellen, die die terminale Differenzierung durchlaufen, sowie an den Rändern von Wunden und bei inflammatorischen Prozessen.

Die gewonnenen Ergebnisse aus diesen Untersuchungen zeigen einen weiteren möglichen Pathomechanismus zur Entstehung und Unterhaltung der Pathogenese der Psoriasis auf. Hier bleibt zu berücksichtigen, dass es sich dabei um einen Teilaspekt einer multifaktoriell bedingten und komplexen Erkrankung handelt. Daher sind weitere Untersuchungen zur hier aufgestellten Hypothese erforderlich.

6. Literaturverzeichnis

- **Aeschlimann**, D. and Paulsson, M. (1991): Cross-linking of laminin-nidogen complexes by tissue transglutaminase. A novel mechanism for basement membrane stabilization. *J. Biol. Chem.* 266, 15308-15317
- **Aeschlimann**, D. and Thomazy, V. (2000): Protein crosslinking in assembly and remodelling of ECM. *Connect. Tissue Res.* 41, 1-27
- **Aeschlimann**, D., Kaupp, O. and Paulsson, M. (1995): Transglutaminase-catalyzed matrix cross-linking in differentiating cartilage: identification of osteonectin as a major glutaminyl substrate. *J. Cell Biol.* 129, 881-892
- **Akiyama**, M. (2006): Harlequin ichthyosis and other autosomal recessive congenital ichthyoses: the underlying genetic defects and pathomechanisms. *J. Dermatol. Sci.* 42, 83–89
- **Akiyama**, M., Takizawa, Y., Kokaji, T., Shimizu, H. (2001): Novel mutations of TGM1 in a child with congenital ichthyosiform erythroderma. *Br. J. Dermatol.* 144(2), 401-407
- **Antonyak**, M. A.; Jansen, J. M.; Miller, A. M.; Ly, T. K.; Endo, M.; Cerione, R. A. (2006): Two isoforms of tissue transglutaminase mediate opposing cellular fates. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 103, 18609-18614
- **Aringer**, M., Smolen, J. S. (2005): Cytokine expression in lupus kidneys. *Lupus* 14, 13-18
- **Baek**, K. J., Das, T., Gray, C. D., Desai, S., Hwang, K. C., Gacchui, R., Ludwig, M., Im, M. J. (1996): A 50 KDa protein modulates guanine nucleotide binding of transglutaminase II. *Biochemistry* 35(8), 2651-2657
- **Benes**, P., Vetvicka, V., Fusek, M. (2008): Cathepsin D – many functions of one aspartatic protease. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 68(1), 12–28
- **Bernard**, B. A., Asselineau, D., Schaffar-Deshayes, L., Darmon, M. Y. (1988): Abnormal sequence of expression of differentiation markers in psoriatic epidermis: inversion of two steps in the differentiation program? *J. Invest. Dermatol.* 90, 801–805
- **Boukamp**, P., Petrussevska, R. T., Breitkreuz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N. E. (1988): Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106, 761-771
- **Bowness**, J. M. and Tarr, A. H. (1997): Increase in transglutaminase and its extracellular products in response to an inflammatory stimulus by lipopolysaccharide. *Mol. Cell Biochem.* 169, 157-163

- **Boyman**, O., Hefti, H. P., Conrad, C., Nickoloff, B. J., Suter, M., Nestle, F. O. (2004): Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role for resident T cells and tumor necrosis factor- α . *J. Exp. Med.* 199, 731-736
- **Candi**, E., Melino, G., Lahm, A., Ceci, R., Rossi, A., Kim, I.-G., Ciani, B. and Steinert, P. M. (1998): Transglutaminase 1 mutations in lamellar ichthyosis. Loss of activity due to failure of activation by proteolytic processing. *J. Biol. Chem.* 273, 13693-13702
- **Chavanas**, S., Bodemer, C., Rochat, A., Hamel-Teillac, D., Ali, M., Irvine, A. D., Bonafé, J. L., Wilkinson, J., Taïeb, A., Barrandon, Y., Harper, J. I., de Prost, Y., Hovnanian, A. (2000): Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nat. Genet.* 25, 141-142
- **Chen**, B. S., Wang, M. R., Xu, X., Cai, Y., Xu, Z. X., Han, Y. L., Wu, M. (2000a): Transglutaminase- 3, an esophageal cancer-related gene. *Int. J. Cancer* 88, 862-865
- **Chen**, R., Gao, B., Huang, C., Olsen, B., Rotundo, R. F., Blumenstock, F., Saba, T. M. (2000b): Transglutaminase-mediated fibronectin multimerization in lung endothelial matrix in response to TNF- α . *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279, L161-L174
- **Chen**, S.-H., Arany, I., Apisarnthanarax, N., Rajaraman, S., Tying, S. K., Horikoshi, T., Brysk, H., Brysk, M. M. (2000c): Response of keratinocytes from normal and psoriatic epidermis to interferon- γ differs in the expression of zinc- α_2 -glycoprotein and cathepsin D. *FASEB-J.* 14, 565-571
- **Cheng**, T., Hitomi, K., van Vlijmen-Willems, I. M., de Jongh, G. J., Yamamoto, K., Nishi, K., Watts, C., Reinheckel, T., Schalkwijk, J., Zeeuwen, P. L. (2006): Cystatin M/E is a high affinity inhibitor of cathepsin V and cathepsin L by a reactive site that is distinct from the legumain-binding site. A novel clue for the role of cystatin M/E in epidermal cornification. *J. Biol. Chem.* 281(23), 15893-15899
- **Chung**, S. I., Folk, J. E. (1972): Transglutaminase from hair follicle of guinea pig (crosslinking-fibrin-glutamyllysine-isoenzymes-purified enzyme). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 303-307
- **Corbett**, S. A., Lee, L., Wilson, C. L. and Schwarzbauer, J. E. (1997): Covalent crosslinking of fibronectin to fibrin is required for maximal cell adhesion to a fibronectin-fibrin matrix. *J. Biol. Chem.* 272, 24999-25005
- **D'Argenio**, G., Biancone, L., Cosenza, V., Della Valle, N., D'Armiento, F. P., Boirivant, M., Pallone, F., Mazzacca, G. (1995): Transglutaminases in Crohn's disease. *Gut* 37, 690-695

- **Datta**, S., Antonyak, M. A., Cerione, R. A. (2007): GTP-binding-defective forms of tissue transglutaminase trigger cell death. *Biochemistry* 46, 14819–14829
- **Eckert**, R. L., Sturniolo, M. T., Broome, A-M., Ruse, M., Rorke, E. A. (2005): Transglutaminase Function in Epidermis. *J. Invest. Dermatology* 124, 481-492
- **Egberts**, F., Heinrich, M., Jensen, J-M., Winoto-Morbach, S., Pfeiffer, S., Wickel, M., Schunck, M., Steude, J., Saftig, P., Proksch, E., Schütze, S. (2004): Cathepsin D is involved in the regulation of transglutaminase 1 and epidermal differentiation. *J. Cell Sci.* 117, 2295-2307
- **Elias**, P. M., Friend, D. S. (1975): The permeability barrier in mammalian epidermis. *J. Cell Biol.* 65, 180-191
- **Ettehadi**, P., Greaves, M. W., Wallach, D., Aderka, D., Camp, R. D. (1994): Elevated tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) biological activity in psoriatic skin lesions. *Clin. Exp. Immunol.* 96(1), 146-151.
- **Facchiano**, F., Facchiano, A. and Facchiano, A. M. (2006): The role of transglutaminase- 2 and its substrates in human diseases. *Front. Biosci.* 11, 1758-1773
- **Falasca**, L., Iadevaia, V., Ciccocanti, F., Melino, G., Serafino, A., Piacentini, M. (2005): Transglutaminase type II is a key element in the regulation of the anti-inflammatory response elicited by apoptotic cell engulfment. *J. Immunol.* 174, 7330-7340
- **Fésüs**, L., Szondy, Z. (2005): Transglutaminase 2 in the balance of cell death and survival. *FEBS Lett.* 579(15), 3297-3302
- **Fröhlich**, E., Möhrle, M., Klessen, C. (2004): Cathepsins in basal cell carcinomas: activity, immunoreactivity and mRNA staining of cathepsins B, D, H and L. *Arch. Dermatol. Res.* 295(10), 411-421
- **Gaudry**, C. A., Verderio, E., Aeschlimann, D., Cox, A., Smith, C. And Griffin, M. (1999): Cell surface localization of TG2 is dependent on a fibronectin binding site in its N-terminal b-sandwich domain. *J. Biol. Chem.* 274, 30707-30714
- **Gieselmann**, V., Hasilik, A., von Figura, K. (1985): Processing of human cathepsin D in lysosomes in vitro. *J. Biol. Chem.* 260, 3215–3220
- **Greenberg**, C. S., Birckbichler, P. J., Rice, R. H. (1991): Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB-J.* 5, 3071-3077
- **Grenard**, P., Bates, M. K., Aeschliemann, D. (2001): Evolution of transglutaminase genes: identification of a transglutaminase gene cluster on human chromosome

- 15q15. Structure of the gene encoding transglutaminase X and a novel gene family member, transglutaminase Z. *J. Biol. Chem.* 276(35), 33066-33078
- **Harrison**, C. A., Layton, C. M., Hau, Z., Bullock, A. J., Johnson, T. S., MacNeil, S. (2007): Transglutaminase inhibitors induce hyperproliferation and parakeratosis in tissue-engineered skin. *Br. J. Dermatol.* 156(2), 247-257
 - **Hayward**, A. F. (1979): Membrane-coating granules. *Int. Rev. Cytol.* 59, 97-127
 - **Heinrich**, M., Neumeyer, J., Jakob, M., Hallas, C., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Wickel, M., Schneider-Brachert, W., Trauzold, A., Hethke, A., Schütze, S. (2004): Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death Differ.* 11(5), 550-563
 - **Heinrich**, M., Wickel, M., Winoto-Morbach, S., Schneider-Brachert, W., Weber, T., Saftig, P., Peters, C., Krönke, M., Schütze, S. (2000): Ceramide as an activator lipid of cathepsin D. *Adv. Exp. Med. Biol.* 477, 305-315
 - **Herman**, M. L., Farasat, S., Steinbach, P. J., Wei, M. H., Toure, O., Fleckman, P., Blake, P., Bale, S. J., Toro, J. R. (2009): Transglutaminase-1 gene mutations in autosomal recessive congenital ichthyosis: summary of mutations (including 23 novel) and modeling of TGase-1. *Hum. Mutat.* 30(4), 537-547
 - **Hitomi**, K., Ikeda, N., Maki, M. (2003): Immunological detection of proteolytically activated epidermal-type transglutaminase (TGase 3) using cleavage-sitespecific antibody. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 2492–2494
 - **Hohl**, D., Aeschlimann, D. and Huber, M. (1998): In vitro and rapid in situ transglutaminase assays for congenital ichthyoses. *J. Invest. Dermatol.* 110, 268-271
 - **Horikoshi**, T., Arany, I., Rajaraman, S., Chen, S.-H., Brysk, H., Lei, G., Tying, S. K., Brysk, M. M. (1998): Isoforms of cathepsin D and human epidermal differentiation. *Biochimie (Paris)* 80, 605–612
 - **Horikoshi**, T., Igarashi, S., Uchiwa, H., Brysk, H., Brysk, M. M. (1999): Role of endogeneous cathepsin D-like and chymotrypsin-like proteolysis in human epidermal desquamation. *Br. J. Dermatol.* 141, 453-459
 - **Huber**, M., Rettler, I., Bernasconi, K., Frenk, E., Lavrijsen, S. P. M., Ponec, M., Bon, A., Lautenschlager, S., Schorderet, D. F. and Hohl, D. (1995): Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis. *Science* 267, 525-528
 - **Ichinose**, A., Bottenus, R. E. and Davie, E. W. (1990): Structure of transglutaminases. *J. Biol. Chem.* 265, 13411-13414

- **Ishida-Yamamoto**, A., Simon, M., Kishibe, M., Miyauchi, Y., Takahashi, H., Yoshida, S., O'Brien, T. J., Serre, G., Iizuka, H. (2004): Epidermal Lamellar Granules Transport Different Cargoes as Distinct Aggregates. *J. Invest. Dermatology* 122, 1137-1144
- **Jensen**, J. M., Proksch, E. (2009): The skin's barrier. *G. Ital. Dermatol. Venereol.* 144(6), 689-700.
- **John**, S. (2006): Die Inaktivierung des TGM3 Gens in der Maus und ihre Auswirkung auf die Haarmorphogenese. *Naturwissenschaftliche Diss.*, Köln
- **Karpuij**, M. V., Becher, M. W., Springer, J. E., Chabas, D., Youssef, S., Pedotti, R., Mitchell, D., Steinman, L. (2002): Prolonged survival and decreased abnormal movements in transgenic model of Huntington disease, with administration of the transglutaminase inhibitor cystamine. *Nat. Med.* 8, 143-149
- **Kawada**, A., Hara, K., Kominami, E., Hiruma, M., Akiyama, M., Ishibashi, A., Ichikawa, E., Nakamura, Y., Watanabe, S., Yamamoto, T., Umeda, T., Nishioka, K. (1997): Expression of cathepsin D and B in invasion and metastasis of squamous cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.* 137(3), 361-366
- **Kim**, H. C., Lewis, M. S., Gorman, J. J., Park, S. C., Girard, J. E., Folk, J. E., Chung, S. I. (1990): Protransglutaminase E from guinea pig skin. Isolation and partial characterization. *J. Biol. Chem.* 265(35), 21971-21978
- **Kim**, I.-G., Gorman, J. J., Park, S.-C., Chung, S.-I. and Steinert, P. M. (1993): The deduced sequence of the novel protransglutaminase E (TGase3) of human and mouse. *J. Biol. Chem.* 268, 12682-12690
- **Kim**, S. Y. (2006): Transglutaminase 2 in inflammation. *Front. Biosci.* 11, 3026-3035
- **Kim**, S.-Y., Chung, S.-I., Yoneda, K. and Steinert, P. M. (1995). Expression of transglutaminase 1 in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 104, 211-217
- **Laemmli**, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* 227, 680-685
- **Lee**, J., Kim, Y. S., Choi, D. H., Bang, M. S., Han, T. R., Joh, T. H., Kim, S. Y. (2004) : Transglutaminase 2 induces nuclear factor-kappaB activation via a novel pathway in BV-2 microglia. *J. Biol. Chem.* 279, 53725-53735
- **Leu**, R. W., Herriott, M. J., Moore, P. E., Orr, G. R. and Birckbichler, P. J. (1982): Enhanced transglutaminase activity associated with macrophage activation: possible role in Fc-mediated phagocytosis. *Exp. Cell Res.* 141, 191-199
- **Madison**, K. C., Sando, G. N., Howard, E. J., True, C. A., Gilbert, D., Swartzendruber, D. C., Wertz, P. W. (1998): Lamellar granule biogenesis: A role for ceramide

glucosyltransferase, lysosomal enzyme transport, and the Golgi. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. 3, 80-86

- **Martinez**, J., Chalupowicz, D. G., Roush, R. K., Sheth, A. and Barsigian, C. (1994): Transglutaminase-mediated processing of fibronectin by endothelial cell monolayers. *Biochemistry* 33, 2538-2545
- **Matsuki**, M., Yamashita, F., Ishida-Yamamoto, A., Yamada, K., Kinoshita, C., Fushiki, S., Ueda, E., Morishima, Y., Tabata, K., Yasuno, H., Hashida, M., Iizuka, H., Ikawa, M., Okabe, M., Kondoh, G., Kinoshita, T., Takeda, J., Yamanishi, K. (1998): Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1044-1049
- **Mhaouty-Kodja**, S. (2004): Ghα/tissue transglutaminase 2: an emerging G protein in signal transduction. *Biol. Cell.* 96(5), 363-367
- **Mok**, C. C., Lau, C. S. (2003): Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Pathol.* 56, 481-490
- **Odland**, G. F. and Holbrook, K. (1981): The lamellar granules of epidermis. *Curr. Probl. Derm.* 9, 29-49
- **Piacentini**, M., Amendola, A., Ciccocanti, F., Falasca, L., Farrace, M. G., Mastroberardino, P. G., Nardacci, R., Oliverio, S., Piredda, L., Rodolfo, C., Autuori, F. (2005): Type 2 transglutaminase and cell death. *Prog. Exp. Tumor Res.* 38, 58 –74
- **Pitidhamabhorn**, D., Kantachuvesiri, S., Totemchokchyakarn, K., Kitiyanant, Y., Ubol, S. (2006): Partial construction of apoptotic pathway in PBMC obtained from active SLE patients and the significance of plasma TNF-alpha on this pathway. *Clin. Rheumatol.* Jan 4, 1-10
- **Russell**, L. J., DiGiovanna, J. J., Rogers, G. R., Steinert, P. M., Hashem, N., Compton, J. G. and Bale, S. J. (1995): Mutations in the gene for transglutaminase 1 in autosomal recessive lamellar ichthyosis. *Nat. Genet.* 9, 279-283
- **Saftig**, P., Hetman, M., Schmahl, W., Weber, K., Heine, L., Mossmann, H., Köster, A., Hess, B., Evers, M., von Figura, K. and Peters, C. (1995): Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. *EMBO-J.* 14, 3599-3608
- **Santos**, M., Torné, J. M. (2009): Recent patents on transglutaminase production and applications: a brief review. *Recent Pat. Biotechnol.* 3(3), 166-174
- **Small**, K., Feng, J. F., Lorenz, J., Donnelly, E. T., Yu, A., Im, M. J., Dorn, G. W. and Liggett, S. B. (1999): Cardiac specific overexpression of TG2 (Gh) results in a unique

hypertrophy phenotype independent of PLC activation. J. Biol. Chem. 274, 21291-21296

- **Sprecher**, E., Ishida-Yamamoto, A., Mizrahi-Koren, M., Rapaport, D., Goldsher, D., Indelman, M., Topaz, O., Chefetz, I., Keren, H., O'brien, T. J., Bercovich, D., Shalev, S., Geiger, D., Bergman, R., Horowitz, M., Mandel, H. (2005): A mutation in SNAP29, coding for a SNARE protein involved in intracellular trafficking, causes a novel neurocutaneous syndrome characterized by cerebral dysgenesis, neuropathy, ichthyosis, and palmoplantar keratoderma. Am. J. Hum. Genet. 77, 242-251
- **Steven**, A. C., Steinert, P. M. (1994): Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. J. Cell Sci. 107(Pt 2), 693-700
- **Suh**, G. Y., Ham, H. S., Lee, S. H., Choi, J. C., Koh, W. J., Kim, S. Y., Lee, J., Han, J., Kim, H. P., Choi, A. M., Kwon, O. J. (2006) : A peptide with anti-transglutaminase activity decreases lipopolysaccharide-induced lung inflammation in mice. Exp. Lung. Res. 32, 43-53
- **Szondy**, Z., Sarang, Z., Molnar, P., Nemeth, T., Piacentini, M., Mastroberardino, P. G., Falasca, L., Aeschlimann, D., Kovacs, J., Kiss, I., Szegezdi, E., Lakos, G., Rajnavolgyi, E., Birckbichler, P. J., Melino, G., Fesus, L. (2003): Transglutaminase 2 $-/-$ mice reveal a phagocytosis-associated crosstalk between macrophages and apoptotic cells. Proc. Nat. Acad. Sci. 100, 7812-7817
- **Towbin**, H. T. M., Staehelin, T. M., Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354
- **Uemura**, N., Nakanishi, Y., Kato, H., Saito, S., Nagino, M., Hirohashi, S., Kondo, T. (2009): Transglutaminase 3 as a prognostic biomarker in esophageal cancer revealed by proteomics. Int. J. Cancer 124, 2106-2115
- **Verderio**, E., Nicholas, B., Gross, S. and Griffin, M. (1998): Regulated expression of TG2 in Swiss 3T3 fibroblasts. Exp. Cell Res. 239, 119-138

7. Anhang

7.1 Negativkontrolle der CATD-defizienten Fibroblasten

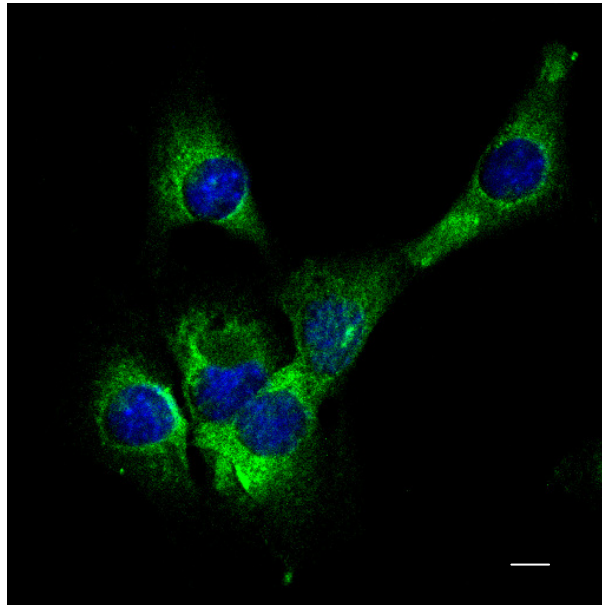


Abb. 21: Kein Nachweis von CATD (rot) in den CATD-defizienten Fibroblasten. Transglutaminase 3 erscheint grün. Primärer Anti-TG3-AK von Abcam (ab 27001) rabbit polyclonal + sekundärer AF-555 donkey anti-rabbit-AK (rot), sowie primärer Anti-CATD-AK (R&D Systems) polyclonal goat against mouse + sekundärer AF-633 donkey anti-goat-AK (violett). Veränderung der Farbe mit der Wellenlänge 555 nm (Transglutaminase 3) am LSM in die Farbe Grün zur besseren Unterscheidung der beiden Rottöne. Größenbalken: 10 µm

7.2 Transglutaminase 3 / Wildtyp-, CATD-defiziente- und mit CATD retransfizierte Fibroblasten

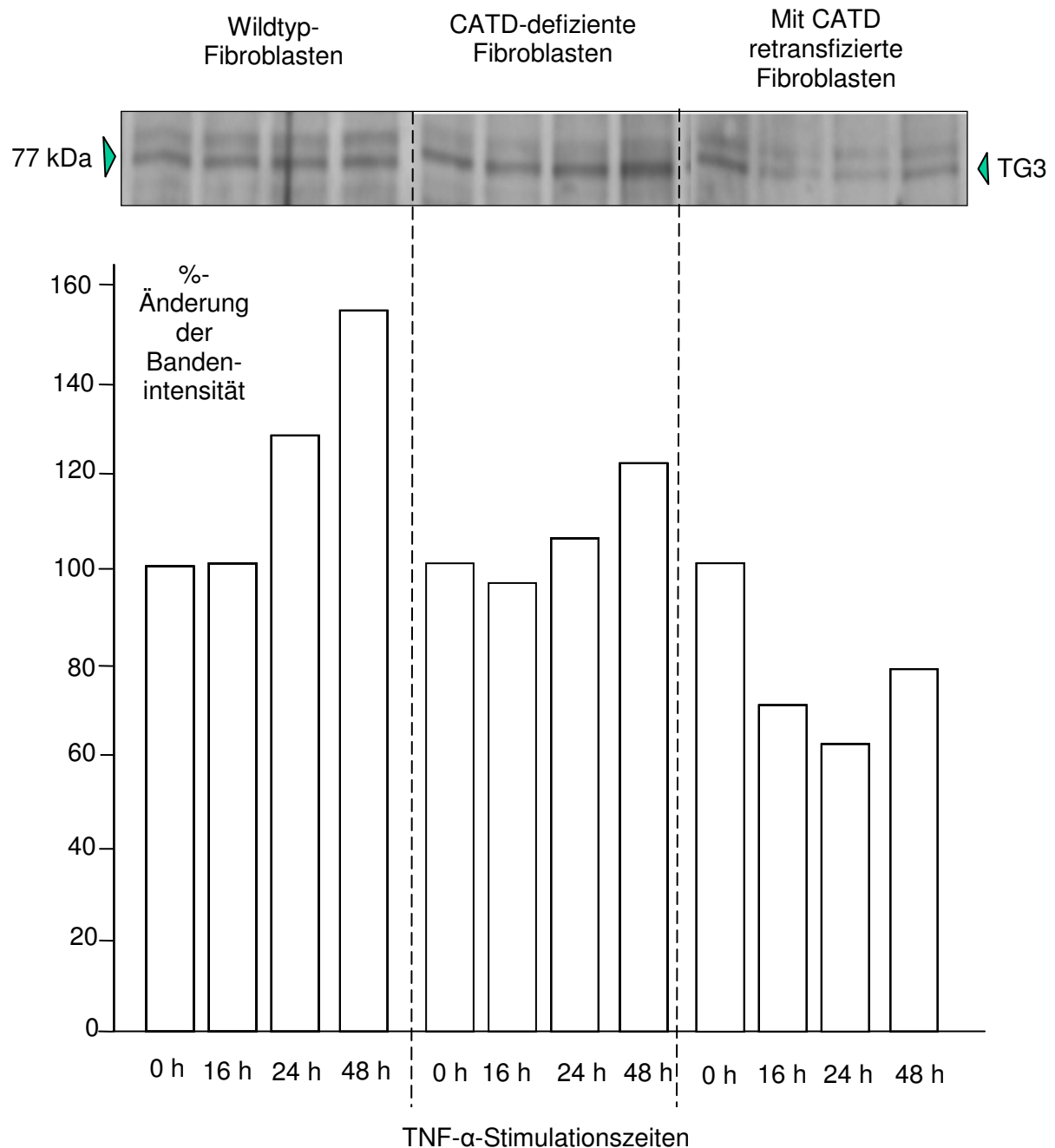


Abb. 22: Zunahme der 77 kDa-Bande in den Wildtyp-Fibroblasten nach Stimulation mit TNF- α . Auch Zunahme der 77 kDa-Bande in den CATD-defizienten Fibroblasten. Eher eine tendenzielle Abnahme der 77 kDa-Bande in den mit CATD retransfizierten Fibroblasten.

7.3 Verwendete primäre und sekundäre Antikörper in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie

Wildtyp-Fibroblasten

Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper
Transglutaminase 1 (ab 19936)	AF-488 donkey anti-mouse
CATD (R&D Systems)	AF-555 donkey anti-goat
Transglutaminase 2 (Labvision/Ab-4)	AF-555 donkey anti-rabbit
CATD (R&D Systems)	AF-633 donkey anti-goat
Transglutaminase 3 (ab 27001)	AF-555 donkey anti-rabbit
CATD (R&D Systems)	AF-633 donkey anti-goat

CATD-Retransfizierte Fibroblasten

Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper
Transglutaminase 1 (ab 19936)	AF-488 donkey anti-mouse
CATD (Calbiochem)	AF-555 donkey anti-rabbit
Transglutaminase 2 (Labvision/Ab-4)	AF-555 donkey anti-rabbit
CATD (Santa Cruz/E7)	AF-488 donkey anti-mouse
Transglutaminase 3 (ab 27001)	AF-555 donkey anti-rabbit
CATD (Santa Cruz/E7)	AF-488 donkey anti-mouse

HaCat-Zellen

Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper
Transglutaminase 1 (ab 19936)	AF-488 donkey anti-mouse
CATD (Calbiochem)	AF-555 donkey anti-rabbit
Transglutaminase 2 (Labvision/Ab-4)	AF-555 donkey anti-rabbit
CATD (Santa Cruz/E7)	AF-488 donkey anti-mouse
Transglutaminase 3 (ab 27001)	AF-555 donkey anti-rabbit
CATD (Santa Cruz/E7)	AF-488 donkey anti-mouse

Tab.4: In den Versuchen verwendete Antikörper

8. Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. rer. nat. S. Schütze und Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. E. Proksch für die Überlassung des Themas dieser Arbeit.

Besonders zu Dank verpflichtet bin ich dem Institut für Immunologie des UK-SH unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. D. Kabelitz - Arbeitsgruppe Schütze - für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die hervorragende Unterstützung bei der Durchführung der Experimente sowie der Erstellung dieser Dissertation.

Danken möchte ich insbesondere auch Herrn Dr. rer. nat. Supandi Winoto-Morbach und Frau A. Hethke, die mir mit Rat und Tat während der gesamten Zeit zur Seite standen.

Meine besondere Dankbarkeit gilt meiner Familie, Frau Dr. med. K. H. Stürner und Herrn O. Schriever für die langjährige Unterstützung und Motivation.

9. Curriculum vitae

11. März 1977	Isabel Hellmich geboren in Flensburg Eltern: Helga Hellmich, geb. Röschmann Hans-Jürgen Hellmich
1984 - 1988	Grund- und Hauptschule der Stadt Glücksburg
1988 - 1994	Realschule Flensburg-Ost
1994 - 1997	Fachgymnasium Sozialwirtschaft Hannah-Arendt-Schule Abschluss: Abitur
1997-98	Auslandsaufenthalt als Au Pair in den USA, New Jersey
1999-2001	Ausbildung und Abschluss zur Milchwirtschaftlichen Laborantin Landwirtschaftskammer Hannover
WS 2001/02	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Christian- Albrechts-Universität zu Kiel
04/2004	1. medizinisches Staatsexamen/Physikum
10/2008	2. medizinisches Staatsexamen
01/2009	Assistenzärztin der Abteilung für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin am Elbe Klinikum Stade